

Genexpression
im Archaeobakterium Sulfolobus:
Untersuchungen
anhand des virusartigen Partikels SSV1
und der ribosomalen RNA-Gene

Wolf-Dieter Reiter

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0046

Genexpression im Archaeobakterium *Sulfolobus*:
Untersuchungen anhand des virusartigen Partikels
SSV1 und der ribosomalen RNA-Gene

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Wolf-Dieter Reiter
aus Berlin

München, 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Zillig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.4.88

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1985 bis Dezember 1987 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Wolfram Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Ich danke Herrn Zillig für die Förderung meiner Arbeit und Herrn Palm für die Unterstützung bei der Auswertung von DNA-Sequenzdaten. Weiterhin danke ich Gabriela Simon und Bernd Grampp für technische Assistenz sowie den Tübinger Studenten Jörg Kaniecki und Wolfgang Voos für ihre engagierte Mitarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	EINLEITUNG	4
III.	MATERIAL UND METHODEN	8
1.	Material	8
1.1.	Besondere Chemikalien und Hilfsmittel	8
1.2.	Enzyme	9
1.3.	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	9
1.4.	Bakterienstämme	10
2.	Methoden	11
2.1.	UV-Bestrahlung von <i>Sulfolobus</i> B12	11
2.2.	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Sulfolobus</i> B12	11
2.3.	Isolierung von Plasmid-DNA	11
2.4.	Agarosegelelektrophorese	12
2.5.	Southern-Transfer	12
2.6.	Northern-Transfer	12
2.7.	Nick-Translation	12
2.8.	Radioaktive Markierung von DNA über "random priming"	13
2.9.	Radioaktive Markierung einzelsträngiger M13-DNA	14
2.10.	Filterhybridisierung	14
2.11.	Autoradiographie	15
2.12.	Gewinnung von DNA aus Agarosegelen	15
2.13.	Klonierungen in pBR322	16
2.13.1.	Klonierung von pSM1	16
2.13.2.	Klonierung von <i>intB</i>	16
2.14.	Klonierungen in M13	17

2.15.	Isolierung von ribosomaler RNA aus <i>Sulfolobus</i> B12	17
2.16.	Radioaktive Markierung von ribosomalen RNAs	17
2.17.	Identifizierung von rekombinanten λ -Phagen mit rDNA-Inserts	18
2.18.	Isolierung von λ -DNA	18
2.19.	DNA-Sequenzanalyse	18
2.20.	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Sulfolobus</i> B12	19
2.21.	S1-Kartierung von RNAs	20
2.21.1.	Gewinnung von 5'-markierter einzelsträngiger DNA	20
2.21.2.	Gewinnung von uniform markierter einzelsträngiger DNA	22
2.21.3.	DNA-RNA-Hybridisierung und Abbau mit S1-Endonuklease	22
2.22.	<i>In vitro</i> -capping von RNA	24
2.23.	Primer-Extensions-Analyse der 5'-Enden von Transkripten	25
IV.	ERGEBNISSE	26
1.	Organisation und Transkription der ribosomalen RNA-Gene von <i>Sulfolobus</i> B12	26
1.1.	Organisation	26
1.2.	Klonierung der rRNA-Gene	29
1.3.	DNA-Sequenzanalyse im Bereich des Gens für 16S rRNA	30
1.4.	Kartierung des Transkriptionsstarts für das 16S/23S rRNA-Operon	31
1.5.	DNA-Sequenzanalyse im Bereich des Gens für 5S rRNA	34
1.6.	Identifizierung des Transkriptionsstarts für das 5S rRNA-Gen	36
1.7.	Kartierung des Transkriptionsstarts für den Leserahmen ORF(5S)	37

2.	Transkription von SSV1	40
2.1.	Identifizierung und Kartierung der SSV1- Transkripte durch Northern-Analyse	40
2.2.	Konstitutive Expression von SSV1-Transkripten	44
2.3.	Transkription von SSV1 nach UV-Bestrahlung	46
2.4.	Strategie zur genauen Kartierung der SSV1-Transkripte	47
2.5.	Gesamtlängenbestimmungen über S1-Analyse	51
2.5.1.	Längenbestimmung von T1 und T2	51
2.5.2.	Längenbestimmung von T _{ind}	52
2.6.	Kartierung von 5'-Enden	53
2.6.1.	Kartierung des 5'-Endes von T1 und T2	53
2.6.2.	Kartierung des 5'-Endes von T3	56
2.6.3.	Kartierung des 5'-Endes von T4	56
2.6.4.	Kartierung der 5'-Enden von T5 und T6	58
2.6.5.	Kartierung des 5'-Endes von T9	61
2.6.6.	Kartierung des 5'-Endes von T _{ind}	61
2.7.	<i>In vitro</i> -capping von SSV1-RNAs	64
2.8.	DNA-Sequenzvergleich in der Umgebung der Transkriptionsstarts	66
2.9.	Kartierung von 3'-Enden	68
2.9.1.	Kartierung der 3'-Enden von T1 und T2	68
2.9.2.	Kartierung des 3'-Endes von T3	71
2.10.	DNA-Sequenzvergleich im Bereich der 3'-Enden der SSV1-Transkripte	71
3.	Integrierte Formen der SSV1-DNA	73
3.1.	Integrationsstelle des gesamten SSV1-Genoms (<i>intA</i>)	73
3.2.	Nachweis weiterer Integrationsstellen und Charakterisierung von <i>intB</i>	75
3.3.	Vergleich der chromosomalen Randsequenzen von <i>intA</i> und <i>intB</i>	77
3.4.	Rekombination zwischen <i>intB</i> und SSV1-DNA	79

V.	DISKUSSION	82
1.	Organisation und Transkription der ribosomalen RNA-Gene	82
2.	Promotersequenzen für die rRNA-Gene von <i>Sulfolobus</i> B12	83
3.	Promotersequenzen für die SSV1-Transkripte	84
4.	Konsensussequenz für archaebakterielle Promotoren	86
5.	Terminatorsequenzen in Archaeobakterien	91
6.	Funktionelle Bedeutung der SSV1-Transkripte	93
7.	Signalstrukturen für die Initiation der Translation in <i>Sulfolobus</i> B12	97
8.	Integrationsstellen der SSV1-DNA	98
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	100
VII.	ABKÜRZUNGEN	111

I. ZUSAMMENFASSUNG

Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Signalstrukturen für die Genexpression in Archaeobakterien, einer eigenständigen Gruppe von Organismen neben den Eubakterien und den Eukaryoten. Als Modellsysteme dienten das UV-induzierbare virusartige Partikel SSV1 des thermoacidophilen Archaeobakteriums *Sulfolobus* sp. Stamm B12 und die ribosomalen RNA-Gene aus dem selben Organismus. Neben dem Studium der Transkription erfolgte in beiden Fällen auch eine Charakterisierung der Genorganisation. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Organisation und Transkription der rRNA-Gene

Die Gene für die drei ribosomalen RNAs liegen in *Sulfolobus* B12 in jeweils einer Kopie pro Genom vor, wobei die Gene für die 16S rRNA und die 23S rRNA unmittelbar hintereinander in der Reihenfolge 5'-16S-23S-3' angeordnet sind und vermutlich kotranskribiert werden. Das Gen für die 5S rRNA liegt in keiner erkennbaren Nachbarschaft zu anderen stabilen RNA-Genen. Der Initiationspunkt für die Transkription der 16S/23S rDNA liegt 139 Nukleotide vor dem Gen für die 16S rRNA und der Initiationspunkt für die Transkription des 5S rRNA-Gens entspricht dem 5'-Ende der reifen RNA. Der Vergleich der DNA-Sequenzen in der Umgebung der beiden Transkriptionsstarts zeigt hochgradig konservierte Bereiche, die vermutlich Promotersequenzen darstellen.



Transkription von SSV1

Das 15,5 kb-Genom von SSV1 wird fast vollständig transkribiert; es lassen sich aufgrund von Northern-Analysen acht RNAs unterscheiden, die unabhängig von der UV-Induktion

konstitutiv exprimiert werden. Zusätzlich wurde eine RNA gefunden, die nur nach vorangegangener UV-Bestrahlung in nennenswerter Menge vorliegt. Für alle diese Transkripte wurde die Lage der jeweiligen 5'-Enden genau kartiert und in zwei Fällen wurde nachgewiesen, daß diese 5'-Enden auf Transkriptionsinitiation zurückgehen. Für zwei überlappende RNAs von SSV1 konnte gezeigt werden, daß sie Strukturproteine der virusartigen Partikel kodieren. Zwei weitere Transkripte fallen in ihrer Lage auf dem SSV1-Genom mit langen offenen Leserahmen zusammen, wobei die Funktion der zugehörigen hypothetischen Proteine jedoch unbekannt ist. Der Vergleich der DNA-Sequenzen in der Umgebung der Transkriptionsstarts der konstitutiven SSV1-RNAs zeigt zwei hochgradig konservierte Bereiche: eine Trinukleotidsequenz in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts und eine Hexanukleotidsequenz etwa 23 Nukleotide davor. Diese Sequenzelemente zeigen große Ähnlichkeiten mit den vermutlichen Promotersequenzen für die rRNA-Gene von *Sulfolobus* B12 und mit entsprechenden Sequenzen aus anderen Archaeobakterien. Die daraus ableitbare archaeobakterielle Promoter-Konsensussequenz ist den eukaryotischen Pol II-Promotoren auffallend ähnlich. Die Analyse der 3'-Enden von fünf SSV1-Transkripten ergab, daß diese Enden innerhalb oder unmittelbar unterhalb von 16-19 Nukleotide langen, pyrimidinreichen Sequenzen kartieren, die in ihrem Anfangsbereich die konservierte Sequenz TTTTTYT enthalten. Die Translation der mRNAs folgt offenbar den in Eubakterien gültigen Prinzipien, d.h. in der Nähe der Initiationskodons treten Sequenzen auf, die zum 3'-Ende der 16S rRNA komplementär sind und somit als Ribosomenbindungsstellen dienen könnten.

Zirkuläre und integrierte Formen der SSV1-DNA

Das Genom von SSV1 liegt in den Wirtszellen sowohl als kovalent geschlossene zirkuläre DNA als auch ortsspezifisch integriert im Chromosom vor. Die integrierte Form ist auf

beiden Seiten von einer 44 Nukleotide langen Sequenz flankiert, die auf der Plasmidform des SSV1-Genoms in einer Kopie vorhanden ist. Neben der in voller Länge integrierten SSV1-DNA (*inta*) sind auf dem Chromosom von *Sulfolobus* B12 weitere Bereiche vorhanden, die zu SSV1-DNA homolog sind. Einer dieser Bereiche (*intB*) wurde näher charakterisiert; er stellt offenbar einen defekten SSV1-Prophagen dar. Die Analyse der chromosomalen Randsequenzen von *inta* und *intB* deutet darauf hin, daß tRNA-Gene die Zielsequenz für SSV1-Integration sind.

Durch homologe Rekombination zwischen *intB* und zirkulärer SSV1-DNA entsteht ein 9 kb-Plasmid, welches ca 1% der cccDNA in *Sulfolobus* B12 ausmacht. Die Rekombinationsstellen wurden durch Klonierung dieses Plasmids und DNA-Sequenzanalyse identifiziert.

II. EINLEITUNG

Vor etwa einem Jahrzehnt wurde durch vergleichende Sequenzanalyse von 16S rRNAs entdeckt, daß die Prokaryoten in phylogenetischer Hinsicht aus zwei Gruppierungen bestehen, die als Eubakterien und Archaeobakterien bezeichnet werden (Woese & Fox, 1977; Woese *et al.*, 1978). Nahezu alle bekannten archaeobakteriellen Isolate lassen sich einer von drei physiologischen Gruppen zuordnen: den extrem halophilen Archaeobakterien, den methanogenen Archaeobakterien und den extrem thermophilen, meist schwefelabhängigen Archaeobakterien (für jeweilige Übersichtsartikel siehe Kushner, 1985, Whitman, 1985 und Stetter & Zillig, 1985).

Die molekularbiologische Charakterisierung der Archaeobakterien hat ergeben, daß sie eine Reihe von Merkmalen mit den Eubakterien gemeinsam haben, während andere Eigenschaften mit den Eukaryoten geteilt werden (Zillig *et al.*, 1985a). Die offensichtlichste Gemeinsamkeit zwischen den Archaeobakterien und den Eubakterien ist die prokaryotische Organisation der Zellen. Darüber hinaus ähneln sich diese beiden Gruppen z.B. in der Größe der Ribosomen, der Organisation von Genen in größeren Transkriptionseinheiten und der Anwesenheit von Shine-Dalgarno-Sequenzen auf mRNAs (eine Übersicht findet sich in Dennis, 1986). Auffallende Gemeinsamkeiten zwischen Archaeobakterien und Eukaryoten sind z.B. das Vorkommen von Introns in Genen für stabile RNAs (Kaine *et al.*, 1983; Daniels *et al.*, 1985; Kjems & Garrett, 1985; Wich *et al.*, 1987; Kaine, 1987), die Eigenschaften und Aminosäuresequenzen von Elongationsfaktoren der Proteinbiosynthese (Kessel & Klink, 1980; Lechner & Böck, 1987), die Komponentenmuster und Aminosäuresequenzen der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Huet *et al.*, 1983; Zillig *et al.*, 1985a, 1985b; Pühler *et al.*, 1988) und das Vorkommen von durch Aphidicolin hemmbaren DNA-Polymerasen (Zabel *et al.*, 1985; Prangishvili, 1986). Aufgrund dieser mosaikartigen

Verteilung von Merkmalsausprägungen zwischen Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten kann erwartet werden, daß die möglichst genaue molekularbiologische Charakterisierung der Archaeobakterien zu einem vertieften Verständnis der frühen Evolution der Organismen führen wird.

Eine in diesem Zusammenhang interessante Frage ist diejenige nach der Evolution der Transkription, was sowohl die Evolution der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen als auch die Evolution der von diesen Enzymen erkannten Promoterstrukturen umfaßt. Eine Untersuchung der archaeobakteriellen RNA-Polymerasen zeigte, daß offenbar nur ein einziges transkribierendes Enzym in Archaeobakterien existiert, eine Situation, wie sie auch in Eubakterien angetroffen wird (eine Übersicht findet sich in Zillig *et al.*, 1985b). Andererseits sind das Komponentenmuster und die Aminosäuresequenzen von archaeobakteriellen RNA-Polymerasen sehr ähnlich denen der eukaryotischen Enzyme und deutlich verschieden von denen der eubakteriellen RNA-Polymerasen (Huet *et al.*, 1983; Pühler *et al.*, 1988). Was die Charakterisierung archaeobakterieller Promotersequenzen betrifft, so lagen zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenige Kartierungsdaten für Transkriptionsstarts vor (DasSarma *et al.*, 1984; Betlach *et al.*, 1984). Inzwischen wurden solche Ergebnisse für mehrere Archaeobakterien veröffentlicht, wobei die meisten Daten anhand von Genen für stabile RNAs gewonnen wurden (Dennis, 1985; Wich *et al.*, 1986, 1987). Dabei zeigten sich konservierte DNA-Sequenzen in der Umgebung von Transkriptionsstarts, aufgrund derer für jedes der untersuchten Archaeobakterien bestimmte Promotersequenzen postuliert wurden. Es war jedoch unklar, ob Archaeobakterien für die Expression von stabilen RNA-Genen und für die Expression von Proteingenen ähnliche Promotersequenzen benutzen und es war weiterhin unklar, ob es eine für alle Archaeobakterien gültige Promoter-Konsensussequenz gibt.

Um zur Klärung dieser Fragen beizutragen, wurde in dieser Arbeit die Genexpression im extrem thermophilen Archaeobakterium *Sulfolobus* untersucht, für das bis dahin keine Daten über Transkriptionsstarts vorlagen. Um die Promotersequenzen für stabile RNA-Gene zu charakterisieren, wurden die ribosomalen RNA-Gene kloniert und die zugehörigen Transkriptionsstarts kartiert. Zur Aufklärung der Promoterstrukturen für Proteingene in *Sulfolobus* wurden Transkripte des UV-induzierbaren virusartigen Partikels SSV1 (Martin et al., 1984) kartiert. Für SSV1 waren zu Beginn dieser Arbeit bereits die gesamte Nukleinsäuresequenz bekannt (P. Palm, unveröffentlichte Daten), so daß hier sehr gute Voraussetzungen für Transkriptkartierungen vorlagen.

Das virusartige Partikel SSV1 ist ein stabiler genetischer Marker des *Sulfolobus*-Isolats B12, das aus einer heißen Quelle bei Beppu (Japan) isoliert worden war. Das Genom von SSV1 ist eine DNA von 15,5 kb, die in den Zellen sowohl in doppelsträngiger zirkulärer Form als auch ortsspezifisch im Chromosom integriert vorliegt (Yeats et al., 1982). Die auf das Wirtschromosom bezogene Kopienzahl der zirkulären SSV1-DNA ist unter normalen Wachstumsbedingungen relativ niedrig (ca. 2-5), erhöht sich jedoch sehr stark nach UV-Bestrahlung der Zellen. Die UV-bedingte Amplifikation der SSV1-DNA ist von der Freisetzung zitronenförmiger Partikel mit den Dimensionen 60x100 nm begleitet (Martin et al., 1984). Etwa 20 Stunden nach der UV-Induktion hört die Produktion von SSV1 wieder auf und die Zellen kehren in ihren ursprünglichen, nicht-induzierten Zustand zurück. Eine Freisetzung von SSV1 wird auch ohne UV-Bestrahlung in geringem Maße beobachtet; der Titer an SSV1 nach UV-Induktion ist jedoch um etwa zwei Größenordnungen höher als die spontan erfolgende Freisetzung und kann maximal etwa 5×10^{10} Partikel pro Milliliter erreichen. An verschiedenen *Sulfolobus*-Isolaten durchgeführte Infektionsversuche führten zu keinem positiven Ergebnis (S. Yeats, unveröffentlichte Ergebnisse). Da zudem von dem

"lysogenen" Wirt *Sulfolobus* B12 keine Varianten existieren, die das SSV1-Genom vollständig verloren haben, ist kein Wirt verfügbar, von dem mit großer Wahrscheinlichkeit eine Sensitivität gegenüber der Infektion mit SSV1 erwartet werden kann. Es ist somit unklar, ob SSV1 ein infektiöses Virus mit engem Wirtsbereich darstellt oder ob es sich um ein defektes Virus handelt.

Soweit es SSV1 betrifft, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der genauen Kartierung von Transkripten, um daraus die Signalstrukturen für die Initiation und die Termination der Transkription in *Sulfolobus* abzuleiten. Um zum Verständnis des Verhältnisses zwischen SSV1 und seinem Wirt beizutragen, wurden zusätzlich zu diesen Transkriptionsstudien auch Untersuchungen über die Integrationsstellen des SSV1-Genoms vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß tRNA-Gene als Zielsequenzen der SSV1-Integration dienen.

Ein Teil der hier zu berichtenden Ergebnisse ist bereits veröffentlicht (Reiter et al., 1987a, 1987b, 1987c, 1988).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Besondere Chemikalien und Hilfsmittel:

Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Cäsiumtrifluoracetatlösung	Pharmacia, Uppsala
Polyethylenglykol 6000	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
N-Lauroylsarkosin (Na-Salz)	Sigma, St. Louis
Acrylamid	Bio-Rad, Richmond
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio-Rad, Richmond
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TMED)	Bio-Rad, Richmond
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, Richmond
Formamid p.a.	Merck, Darmstadt
<i>E. coli</i> tRNA	Sigma, St. Louis
Kalbsthymus- und Lachssperma-DNA	Sigma, St. Louis
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Agarose	BRL, Gaithersburg
Niedrigschmelzende Agarose	FMC BioProducts, Rockland
Sephadex G-50	Pharmacia, Uppsala
Nitrocellulose (BA 85)	Schleicher & Schüll, Dassel
Hefeextrakt, Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Röntgenfilm und Verstärkerfolie	3M, München
M13-Hybridisierungs- und Sequenzierungsprimer	Boehringer Mannheim
Radioaktiv markierte Verbindungen	Amersham Buchler, Braunschweig

1.2. Enzyme:

Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim, Pharmacia, New England Biolabs, BRL
S1 Endonuklease	Pharmacia, Uppsala
T4 Polynukleotidkinase	Pharmacia, Uppsala
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I	Boehringer Mannheim
Klenow-Enzym	Pharmacia, Uppsala
Guanylyltransferase	
aus Vaccinia-Virus	BRL, Gaithersburg
M-MLV Reverse Transkriptase	BRL, Gaithersburg
Pankreatische RNAase A	Sigma, St. Louis
Pankreatische DNAase I	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Boehringer Mannheim

1.3. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen:

TE-Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

Formamid-Probenpuffer:

Je 0,3 mg/ml Bromphenolblau und Xylencyanol
sowie 20 mM Na-EDTA in entionisiertem Formamid.
Die Farbstoffe wurden in fester Form, das EDTA
als 1 M Lösung (pH 8,3) zugegeben.

Phenol zur Nukleinsäureextraktion:

Phenol mit 0,02% 8-Hydroxychinolin als Stabilisator;
äquilibriert mit TE-Puffer.

Phenol/Chloroform zur Nukleinsäureextraktion:

24:25:1-Gemisch von TE-äquilibriertem Phenol (siehe oben),
Chloroform und Isoamylalkohol.

20x SSC:

3 M Natriumchlorid
0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

1.4. Bakterienstämme

Sulfolobus sp. Stamm B12 (Yeats *et al.*, 1982) wurde aus einer heißen Quelle bei Beppu (Japan) isoliert. Der Organismus wurde bei 80°C im Schüttelbad in Brocks Basalsalzmedium (Brock *et al.*, 1972) gezogen, dem 0,1% Hefeextrakt und 0,2% Saccharose zugesetzt waren (End-pH: 3,5).

Für das Arbeiten mit rekombinanter DNA wurden die *E. coli*-Stämme HB101 (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969), JM101 (Messing, 1983) und Q358 (Karn *et al.*, 1980) verwendet.

2. Methoden

2.1. UV-Bestrahlung von *Sulfolobus* B12

Die Induktion von SSV1 durch UV-Bestrahlung des Wirtsbakteriums erfolgte im Wesentlichen wie von Martin et al. (1984) beschrieben. Die UV-Dosisleistung lag bei $0,2 \text{ W/m}^2$, die Flüssigkeitstiefe bei 1,6 mm, die OD_{600} der Kultur bei 1,25 und die Bestrahlungszeit bei 35 s.

2.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus *Sulfolobus* B12

Die Lyse der Zellen und die Extraktion mit Phenol und Chloroform folgten dem Protokoll von Yeats et al. (1982). Nach der letzten Chloroformextraktion wurde die wäßrige Phase mit zwei Volumina Ethanol versetzt und die DNA an einem Glasstab aufgewickelt. Nach Waschen dieser DNA in 70%igem Ethanol über Nacht und Trocknen an der Luft wurde sie in TE-Puffer mit $50 \mu\text{g/ml}$ RNAase aufgenommen (2 ml Puffer für DNA aus 1 g Zellen) und diese Lösung für eine Stunde bei 60°C inkubiert.

2.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von zirkulärer SSV1-DNA aus *Sulfolobus* B12 sowie zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* im Rahmen von Klonierungen wurde die alkalische Lysemethode von Birnboim & Doly (1979) benützt. Die verwendeten Lösungen entsprachen den Angaben in Maniatis et al. (1982), jedoch wurde für die Präparation von SSV1-DNA kein Lysozym zugegeben. Die Cäsiumchlorid-Gleichgewichtsdichtegradientenzentrifugation in Gegenwart von Ethidiumbromid zur weiteren Reinigung der Plasmid-DNA wurde entsprechend den üblichen Standardverfahren durchgeführt (Maniatis et al., 1982).

2.4. Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,5-2%ige horizontale Agarosegele (20 x 20 cm) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel in Tris-acetat-Puffer (Maniatis *et al.*, 1982) bei 1,5 V/cm über Nacht. Die Gele wurden 20 min in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, 20 min in Wasser entfärbt und unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) photographiert.

Zur Auftrennung von RNA (20 µg pro Spur) wurden Glyoxalgele entsprechend den Angaben von Thomas (1983) verwendet.

2.5. Southern-Transfer

Der Transfer von DNA-Fragmenten von Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter erfolgte im Wesentlichen wie von Southern (1975) und Maniatis *et al.* (1982) beschrieben. Als Pufferreservoir dienten vier Lagen von Whatman 3MM-Papier (30 x 30 cm), die mit 10x SSC durchtränkt waren.

2.6. Northern-Transfer

Der Transfer von auf Glyoxalgelen aufgetrennten RNAs auf Nitrocellulosefilter wurde wie von Thomas (1983) beschrieben durchgeführt. Nach dem Backen der Filter (2 h, 80°C) wurde die RNA durch dreiminütiges Kochen in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 deglyoxyliert.

2.7. Nick-Translation

Zur radioaktiven Markierung von DNA durch Nick-Translation (Rigby *et al.*, 1977) wurde folgender 10 µl-Ansatz verwendet:

50 mM Tris/HCl pH 7,5
10 mM MgCl₂
10 mM 2-Mercaptoethanol
50 µg/ml Gelatine
10 µM dCTP, dGTP, dTTP
50 µCi [α -³²P]dATP (3000 Ci/mMol)
10 pg DNAase I
3 U *E. coli* DNA-Polymerase I
0,2 µg zu markierende DNA

Nach drei Stunden Inkubation bei 14-16°C wurden 40 µl H₂O und 15 µl Stop-Lösung hinzugefügt und die dNTPs über eine Sephadex-G50-Säule (Pasteurpipette) abgetrennt. Als Laufpuffer für die Säule diente TE-Puffer.

Stop-Lösung:

50 mg/ml SDS
2,5 mg/ml Bromphenolblau
150 mM EDTA
0,5 mg/ml *E. coli* tRNA
10 mg/ml Dextranblau

2.8. Radioaktive Markierung von DNA über "random priming"

Die direkte Markierung von DNA-Fragmenten in niedrig-schmelzenden Agarosestücken erfolgte wie von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) beschrieben. Wie bei der Nick-Translation wurden auch hier nach Zugabe von Stop-Lösung (siehe oben) die nicht-eingebauten dNTPs über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Vor dem Säulenlauf wurde der Markierungsansatz 5 min auf 65°C erhitzt, um die agarosebedingte Viskosität der Lösung herabzusetzen.

2.9. Radioaktive Markierung einzelsträngiger M13-DNA.

Zur Präparation strangspezifischer M13-Proben über die Synthese eines zur Vektor-DNA komplementären radioaktiven Stranges wurde die Methode von Hu & Messing (1982) benutzt.

2.10. Filterhybridisierung

Gebackene Nitrocellulosefilter mit gebundener DNA oder RNA wurden in 6x SSC angefeuchtet, in verschweißbaren Tüten 3-10 Stunden bei 68°C vorhybridisiert und anschließend 12-20 Stunden bei 42°C mit radioaktiv markierter DNA oder RNA hybridisiert (ca. 5000 cpm pro cm² Filterfläche). Die Filter wurden anschließend 15 min bei Raumtemperatur in Waschlösung geschüttelt und das Waschen dann für 2-4 Stunden bei höherer Temperatur (60°C-65°C) fortgesetzt. Für die Autoradiographie wurden die noch feuchten Filter auf mit Waschlösung durchtränktes Whatman 3MM-Papier gelegt und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Als Unterlage für das Whatman 3MM-Papier dienten nicht mehr benötigte entwickelte Röntgenfilme.

Lösungen:

Prähybridisierungslösung:

6x SSC

0,5% SDS

100 µg/ml Lachssperma-DNA (hitzenaturiert)

100 µg/ml *E. coli* tRNA

Hybridisierungslösung (formamidfreie Stammlösung):

11x SSC

0,22% SDS

220 µg/ml Lachssperma-DNA (hitzenedenaturiert)

220 µg/ml *E. coli* tRNA

Fertige Hybridisierungslösung:

9 Volumina Hybridisierungslösung (Stammlösung, siehe oben)

10 Volumina Formamid p.a.

1 Volumen radioaktiv markierte Probe

Waschlösung:

1x SSC

0,1% SDS

2.11. Autoradiographie

Die Autoradiographie von Nitrocellulosefiltern oder von Sequenzgelen erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung von X-ray 90 bzw. Trimax Röntgenfilm oder aber bei -80°C mit Hilfe einer Verstärkerfolie (Trimax).

2.12. Gewinnung von DNA aus Agarosegelen

Zur gezielten Gewinnung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA in Dialyseschläuchen elektro-eluiert, das Eluat mit Butanol-(2) eingeengt, mit Phenol und Chloroform extrahiert und ethanolgefällt. Die Durchführung dieser Einzelschritte entsprach den Angaben von Maniatis et

al. (1982). Alternativ dazu wurden DNA-Fragmente auch durch Auflösen der Agarosestücke in Natriumjodidlösung und Adsorption der DNA an Glaspulver gewonnen (Vogelstein & Gillespie, 1979). Die Durchführung letzterer Methode erfolgte mittels des GENE CLEAN-Kits der Firma BIO 101 entsprechend den Instruktionen des Herstellers.

2.13. Klonierungen in pBR322

Die Ligation von gereinigten DNA-Fragmenten in pBR322 (Bolivar et al., 1977), die Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Ligationsansatz und die Identifizierung rekombinanter Klone erfolgte nach Standardverfahren (Maniatis et al., 1982).

2.13.1. Klonierung von pSM1

70 µg Gesamt-cccDNA aus UV-induziertem *Sulfolobus* B12 wurden mit SalI geschnitten und die Fragmente auf einem 0,7%igen präparativen Agarosegel aufgetrennt. Die untere schwache Bande (lineares pSM1) wurde ausgeschnitten und die DNA daraus durch Elektroelution gewonnen. Die Klonierung erfolgte in die SalI-Schnittstelle von pBR322.

2.13.2. Klonierung von *intB*

120 µg Gesamt-DNA aus *Sulfolobus* B12 wurden mit BglII + EcoRI gespalten, die erhaltenen Fragmente auf einem präparativen 1%igen Agarosegel aufgetrennt, der Bereich >6 kb ausgeschnitten und die DNA elektroeluiert. Diese DNA wurde mit XhoI + PvuII nachgespalten (diese Enzyme spalten das BglII/EcoRI-Fragment mit *intB* nicht) und die erhaltenen Fragmente wurden erneut auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Das größte Restriktionsfragment (entsprechend

intB) wurde elektroeluiert und in pBR322 (geschnitten mit EcoRI + BamHI) kloniert.

2.14. Klonierungen in M13

Die Subklonierung von Restriktionsfragmenten in die M13-Vektoren M13mp8 (Messing & Vieira, 1982), M13mpl8 und M13mpl9 (Norrander *et al.*, 1983) sowie M13tg130 und M13tg131 (Kieny *et al.*, 1983) erfolgten entsprechend einem Protokoll von Amersham International. Als Wirt diente *E. coli* JM101.

2.15. Isolierung von ribosomaler RNA aus *Sulfolobus* B12

Die Isolierung von 70S-Ribosomen, ihre Auftrennung in 50S- und 30S-Untereinheiten und die Gewinnung der ribosomalen RNAs über Phenol/Chloroform-Extraktion und fraktionierte Hochsalzfällung wurden wie von Neumann *et al.* (1983) beschrieben durchgeführt.

2.16. Radioaktive Markierung von ribosomalen RNAs

Zur 5'-Markierung von 5S rRNA wurde die RNA mit alkalischer Phosphatase behandelt und anschließend mit Polynukleotidkinase und [γ -³²P]ATP (5000 Ci/mMol) inkubiert (Neumann *et al.*, 1983). Zur Markierung von 16S rRNA und 23S rRNA wurden die beiden Nukleinsäuren durch begrenzte Alkalibehandlung fragmentiert (Doel *et al.*, 1977) und ohne vorangehende Phosphatasebehandlung direkt mit Polynukleotidkinase endmarkiert. Bei Hybridisierungen mit einer bestimmten markierten rRNA wurde jeweils ein 50facher Überschuß der beiden anderen rRNAs (unmarkiert) zugegeben, um störende Hybridisierungssignale aufgrund einer möglichen gegenseitigen Verunreinigung zu unterdrücken.

2.17. Identifizierung von rekombinanten λ -Phagen mit rDNA-Inserts

Eine λ -Genbank von *Sulfolobus* B12 DNA (MboI-Partialspaltung kloniert in BamHI-gespaltenen λ EMBL4 (Frischauf et al., 1983)) wurde auf *E. coli* Q358 als Wirt ausplattiert (ca. 2000 Plaques auf vier Platten). Nach Transfer der λ -DNA auf Nitrocellulosefilter wurden diese mit radioaktiv markierter 16S rRNA bzw. 5S rRNA hybridisiert. Die mit rRNA hybridisierenden Plaques wurden zur Reinigung erneut ausplattiert (50-100 Plaques pro Platte) und die Plaques mit rDNA-Inserts erneut durch Hybridisierung identifiziert. Die technische Durchführung der λ -Plattierung und der Plaque-Hybridisierung entsprachen den Angaben in Maniatis et al. (1982).

2.18. Isolierung von λ -DNA

Zur präparativen Gewinnung von λ -Phagen wurden 6×10^9 Bakterien (*E. coli* Q358) in SM-Medium mit 3×10^8 Phagen infiziert und diese Zellen in einem Volumen von 300 ml über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Reinigung der Phagen aus der lysierten Kultur erfolgte durch Fällung mit PEG 6000 und CsCl-Stufengradientenzentrifugation. Die λ -DNA wurde durch Inkubation der Phagenpräparation mit Proteinase K und anschließender Phenolisierung gewonnen. Die technische Durchführung dieser Schritte einschließlich der erforderlichen Puffer und Medien entsprach den Angaben von Maniatis et al. (1982).

2.19. DNA-Sequenzanalyse

DNA-Sequenzen wurden nach der enzymatischen Methode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung des M13-Klonierungssystems (Sanger et al., 1980; Messing & Vieira, 1982)

bestimmt. Die Sequenzierung ging im Wesentlichen von definierten Restriktionsfragmenten aus; im Falle der Region oberhalb des 16S rRNA-Gens wurden die meisten Sequenzen jedoch von Exonuklease III-erzeugten Deletionsklonen bestimmt (Henikoff, 1984; Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Die Sequenzreaktionen und die Elektrophorese wurden entsprechend einem Protokoll von Amersham International durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung wurde wahlweise [α - 32 P]dATP oder [35 S]dATP α S (je 800 Ci/mMol) eingesetzt. Zur Auswertung der DNA-Sequenzdaten wurden die Programme von Devereux *et al.* (1984) sowie diejenigen der Protein Identification Resource (PIR) verwendet.

2.20. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Sulfolobus* B12

Ein Gramm eingefrorene *Sulfolobus*-Zellen wurden in 15 ml eines SDS-Harnstoff-Puffers (Sather & Agabian, 1985) lysiert und die hochvisköse Lösung mehrfach durch eine Kanüle gepreßt, um die DNA zu scheren. Nach dreimaliger Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform wurde die Nukleinsäure mit 2,5 Volumina Ethanol gefällt, abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen im Exsikkator in 15 ml 7 M Guanidiniumchlorid, 0,025 M Natriumcitrat (pH 7,0) gelöst. Diese Lösung wurde mehrfach mit Phenol/Chloroform extrahiert und die RNA erneut mit 2,5 Volumina Ethanol gefällt. Zur weiteren Reinigung wurde die RNA in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,01 M EDTA gelöst und Cäsium-trifluoracetatlösung bis zu einer Enddichte von 1,75 g/ml zugegeben (Endvolumen: 11 ml). Die Bandierung der RNA erfolgte durch 20stündige Zentrifugation bei 10°C und 65000 rpm im Beckman-Rotor VTi65. Eine flockige Bande in der Röhrchenmitte und die gesamte Lösung darunter wurden gezapft und ethanolgefällt. Die Aufbewahrung der gereinigten RNA erfolgte bei -20°C als Ethanolgefällung.

2.21. S1-Kartierung von RNAs

Zur S1-Kartierung von Transkripten wurde die von Nasmyth (1983) beschriebene Methode in modifizierter Form verwendet.

2.21.1. Gewinnung von 5'-markierter einzelsträngiger DNA

Zur Kartierung der 5'-Enden von Transkripten wurden einzelsträngige DNA-Proben mit [32 P]-Markierung am 5'-Ende verwendet. Da die Nukleotidsequenz im Bereich aller zu kartierender RNAs bekannt war, wurde zunächst für jedes Transkript die Synthese eines zur RNA komplementären Oligonukleotids in Auftrag gegeben, das nach Möglichkeit etwa 100 Nukleotide vom 5'-Ende der RNA entfernt lag. Auf die vermutliche Position des 5'-Endes wurde aufgrund von Northern-Daten geschlossen.

10 pMol Oligonukleotid wurden unter Verwendung von 100 μ Ci [γ - 32 P]ATP (5000 Ci/mMol) und 0,2 U Polynukleotidkinase in einem Volumen von 10 μ l endmarkiert (Maniatis et al., 1982). Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen (10 min, 70°C) inaktiviert. Als Matrize zur Verlängerung der markierten Oligonukleotide dienten M13-Klone, die die Region in der Umgebung des Transkriptionsstarts als Insert-DNA enthielten. 10 μ g M13 (+)-DNA mit dem nicht-kodierenden Strang als Insert wurden mit 1 pMol markiertem Oligonukleotid auf 60°C erhitzt und langsam auf 45°C abkühlen gelassen. Diese Hybridisierung erfolgte in 100 μ l 15 mM Tris/HCl pH 8,0, 7,5 mM MgCl₂. Anschließend wurden 25 μ l einer Lösung aller vier dNTPs (je 0,5 mM) zugegeben und dieser Ansatz mit 10 U Klenow-Enzym 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen (10 min, 70°C) inaktiviert.

Um ein definiertes 3'-Ende zu erhalten, wurde die partiell doppelsträngige DNA anschließend für 45 min bei

37°C mit 70 U eines Restriktionsenzymys gespalten. Die Art des Restriktionsenzymys wurde dabei so gewählt, daß die erwartete Position des Transkriptionsstarts zwischen der Restriktionsschnittstelle und dem 5'-Ende des Oligonukleotids lag. Falls nötig, wurde vor der Enzyminkubation die NaCl-Konzentration auf das für das jeweilige Restriktionsenzym zutreffende Optimum gebracht. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform und anschließender Ethanolfällung wurde die DNA in 10 µl H₂O + 15 µl Formamid-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 4%iges präparatives Sequenzgel (Taschenbreite: 3 cm) aufgetragen. Nach zweistündiger Elektrophorese bei 35 V/cm wurde das markierte DNA-Fragment durch Autoradiographie lokalisiert (20 min Exposition bei Raumtemperatur), das entsprechende Gelstück ausgeschnitten und die DNA in 0,5x TBE-Puffer (Maniatis *et al.*, 1982) bei 15 V/cm 90 min in einem Dialyseschlauch elektroeluiert. Das Eluat wurde dreimal mit Phenol/Chloroform und dreimal mit Chloroform extrahiert und die Radioaktivität über die Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Üblicherweise lag der Meßwert bei 2×10^5 - 1×10^6 cpm für die Gesamtmenge an markiertem Fragment.

Im Falle der S1-Kartierung von endmarkierter RNA wurden einzelsträngige, unmarkierte DNA-Proben benötigt. Die Synthese dieser Proben entsprach dem oben angegebenen Protokoll mit der Ausnahme, daß die eingesetzten Oligonukleotide nicht markiert waren. Um die einzelsträngigen DNA-Proben auf dem präparativen Sequenzgel zu lokalisieren, wurde eine geringe Menge der entsprechenden 5'-markierten Probe in den benachbarten Taschen aufgetragen und deren Position durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Nach Ausschneiden des so identifizierten Gelstücks und Elektroelution der DNA wurde ein Drittel der Gesamtmenge an DNA-Probe auf Papier getüpfelt und eine Woche lang mit Verstärkerfolie autoradiographiert, um eine mögliche Verunreinigung mit den markierten Größenmarkern zu entdecken. Eine solche Verunreinigung konnte in allen Fällen

ausgeschlossen werden.

2.21.2. Gewinnung von uniform markierter einzelsträngiger DNA

Zur Kartierung der 3'-Enden von Transkripten oder zu deren genauen Gesamtlängenbestimmung wurden uniform markierte einzelsträngige DNA-Proben verwendet. Die generelle Vorgehensweise für die Synthese dieser DNA-Proben entsprach derjenigen für die Präparation von 5'-markierter DNA mit folgenden Änderungen:

- a) Das verwendete Oligonukleotid lag in 3'-Position von der zu kartierenden RNA und war nicht endmarkiert.
- b) Der Markierungsansatz umfaßte 1 µg M13 (+)-DNA und 0,2 pMol Oligonukleotid.
- c) Die Verlängerung des Oligonukleotids erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur unter Verwendung von 1 U Klenow-Enzym in Gegenwart von 0,1 mM dGTP, dCTP und dTTP sowie 30-50 µCi [α -³²P]dATP (3000 Ci/mMol) in einem Volumen von 15 µl. Anschließend wurde unmarkiertes dATP bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben und der Ansatz für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- d) Die Schnittstelle des verwendeten Restriktionsenzym zur Erzeugung eines definierten 3'-Endes lag innerhalb des transkribierten Bereichs (Kartierung von 3'-Enden) oder oberhalb des Transkriptionsstarts (Gesamtlängenbestimmung).
- e) Zu dem Markierungsansatz wurden direkt 12 µl Formamid-Probenpuffer gegeben und dieses Gemisch auf ein präparatives Sequenzgel aufgetragen.

2.21.3. DNA-RNA-Hybridisierung und Abbau mit S1-Endonuklease

0,02-30 µg ethanolgefällte Gesamt-RNA plus ethanolgefällte *E. coli* tRNA ad 30 µg wurden abzentrifugiert, das Sediment in ca. 100 µl einer Lösung der markierten einzel-

strängigen DNA aufgenommen (7000-100000 cpm), 1/12 Volumen 4 M NaCl zugegeben und die Nukleinsäure mit 2,5 Volumina Ethanol gefällt (20 min, -80°C). Nach Abzentrifugieren des DNA/RNA-Gemisches und Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das Sediment im Exsikkator getrocknet, in 17,5 μl H_2O aufgenommen und 8 μl Hybridisierungslösung zugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der neben der radioaktiven DNA nur 30 μg *E. coli* tRNA enthielt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht untergetaucht im 65°C -Wasserbad. Anschließend wurden 275 μl S1-Mix zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 μl *E. coli* tRNA (1 mg/ml) und 6 μl 0,5 M EDTA wurde die Nukleinsäure durch Zugabe von 800 μl Ethanol gefällt (20 min, -80°C). Anschließend wurde das ausgefallene Material im Kühlraum abzentrifugiert, der Überstand möglichst vollständig abpipettiert und das Sediment nach Trocknen im Exsikkator in 2,4 μl Formamid-Probenpuffer + 1,6 μl H_2O bei 50°C gelöst. Die Analyse der vor S1-Abbau geschützten DNA-Fragmente erfolgte auf 4%igen oder 6%igen Polyacrylamid-Sequenzgelen mit einer Sequenzreaktion als Größenstandard. Im Falle der Kartierung von 5'-Enden wurde als Sequenzreaktion generell die gleiche Oligonukleotid-Matrizen-Kombination verwendet, die zur Erzeugung der 5'-markierten DNA-Probe diente.

Im Falle der S1-Kartierung endmarkierter RNA wurden 1 μg RNA und ein Drittel der Gesamtmenge an unmarkierter DNA-Probe (siehe Abschnitt 2.21.1) eingesetzt. Die Bedingungen für die DNA-RNA-Hybridisierung und für den S1-Abbau waren wie oben beschrieben.

Hybridisierungslösung:

2,5 M NaCl
0,31 M Pipes, pH 6,9
0,031 M EDTA

10x S1-Puffer:

40 mM ZnSO₄
2,5 M NaCl
0,3 M Natriumacetat/Essigsäure pH 4,6

S1-Mix:

1x S1-Puffer
10 µg/ml hitzedenaturierte Kalbsthymus-DNA
360 U/ml S1-Nuklease

2.22. *In vitro*-capping von RNA

4 µg RNA wurden in 36 µl H₂O gelöst, 30 s auf 95°C erhitzt und dann sofort in einem Eisbad abgeschreckt. Anschließend wurden 4 µl 10x Enzympuffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,9; 12,5 mM MgCl₂; 60 mM KCl; 25 mM DTT) zugegeben und diese Mischung in ein silikonisiertes Eppendorfhütchen mit einrotiertem [α -³²P]GTP (500 µCi; 410 Ci/mMol) überführt. Nach Zugabe von 8 U Vaccinia-Virus-Guanylyltransferase wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von EDTA (2 mM Endkonzentration) beendet und der Ansatz zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Zur wäßrigen Phase wurden anschließend 15 µg *E. coli* tRNA gegeben und die RNA fünfmal in Gegenwart von 2 M Ammoniumacetat ethanolgefällt, um die Hauptmenge an markiertem GTP zu entfernen. Die Menge an eingebautem GTP wurde durch Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität ermittelt.

2.23. Primer-Extensions-Analyse der 5'-Enden von Transkripten

Für die Kartierung der 5'-Enden von RNAs über die Längenmessung von cDNAs wurden in der Regel die gleichen 5'-markierten Oligonukleotide verwendet, die zur Präparation von S1-Proben dienten.

0,1 pMol (4 µl) markiertes Oligonukleotid wurden mit 10 µg (5 µl) Gesamt-RNA und 1 µl Annealing-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,4 M KCl) gemischt, der resultierende Ansatz für eine Minute auf 95°C erhitzt, in ein 55°C-Wasserbad überführt und über einen Zeitraum von 45 min auf 45°C abkühlen gelassen. Anschließend wurden 2 µl Enzym-Puffer (0,6 M Tris/HCl pH 7,5; 0,12 M MgCl₂; 0,025 M DTT), 1,5 µl Actinomycin D (1 mg/ml) und 16 µl eines Gemisches der vier dNTPs (je 0,375 mM) zugegeben und der Ansatz mit 150 U M-MLV Reverser Transkriptase 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einmaliger Extraktion mit Phenol/Chloroform wurde die Nukleinsäure mit 2,5 Volumina Ethanol gefällt und das nach Zentrifugation erhaltene Sediment auf einem 6%igen Sequenzgel analysiert. Wie bei der S1-Analyse diente die korrespondierende Sequenzreaktion als Größenstandard.

IV. ERGEBNISSE

1. Organisation und Transkription der ribosomalen RNA-Gene von *Sulfolobus* B12

1.1. Organisation

Die Organisation der rRNA-Gene von *Sulfolobus* B12 wurde durch Southern-Hybridisierung von Gesamt-DNA mit ^{32}P -markierten ribosomalen RNAs untersucht. Bei Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRV, HindIII und XbaI gab es jeweils ein einziges Fragment, das sowohl mit 16S rRNA als auch mit 23S rRNA hybridisierte (Abb. 1). Die Größe dieses Fragments lag bei 6,4 kb (HindIII), 9,3 kb (EcoRV) bzw. 14,5 kb (XbaI). Die Gene für 16S rRNA und 23S rRNA sind somit eng benachbart und liegen in jeweils einer Kopie pro Genom vor. Ausgehend von einer Länge von ca. 1,5 kb für die 16S rRNA und 3,0 kb für die 23S rRNA konnte aus der Größe des hybridisierenden HindIII-Fragments auf einen maximal möglichen Abstand von 1,9 kb zwischen den beiden Genen geschlossen werden. Zur genaueren Bestimmung dieses Abstandes wurde ein 1,1 kb BglII/BamHI-Fragment (BglII-Schnittstelle in der 16S rDNA, BamHI-Schnittstelle in 3'-Position zur 16S rDNA) in M13tg131 kloniert und die DNA-Sequenz ausgehend von der BamHI-Schnittstelle bestimmt. Ein Vergleich dieser Sequenz mit dem 5'-terminalen Teil der 23S rDNA aus *Sulfolobus solfataricus* (Olsen et al., 1985) zeigte, daß die BamHI-Schnittstelle ca. 0,1 kb innerhalb der 23S rDNA lag (Abb. 2). Durch Sequenzvergleich mit der 16S rDNA aus *Sulfolobus solfataricus* (Olsen et al., 1985) zeigte sich weiterhin, daß die von der BamHI-Schnittstelle aus gelesene Sequenz bereits das 3'-Ende der 16S rDNA enthielt. Somit war es möglich, sowohl die Sequenz dieses 3'-Endes zu bestimmen als auch den Abstand zwischen den beiden rRNA-Genen festzulegen. Dieser Abstand betrug etwa 192 Nukleotide; die verbliebene Ungenauigkeit ist dadurch bedingt, daß die

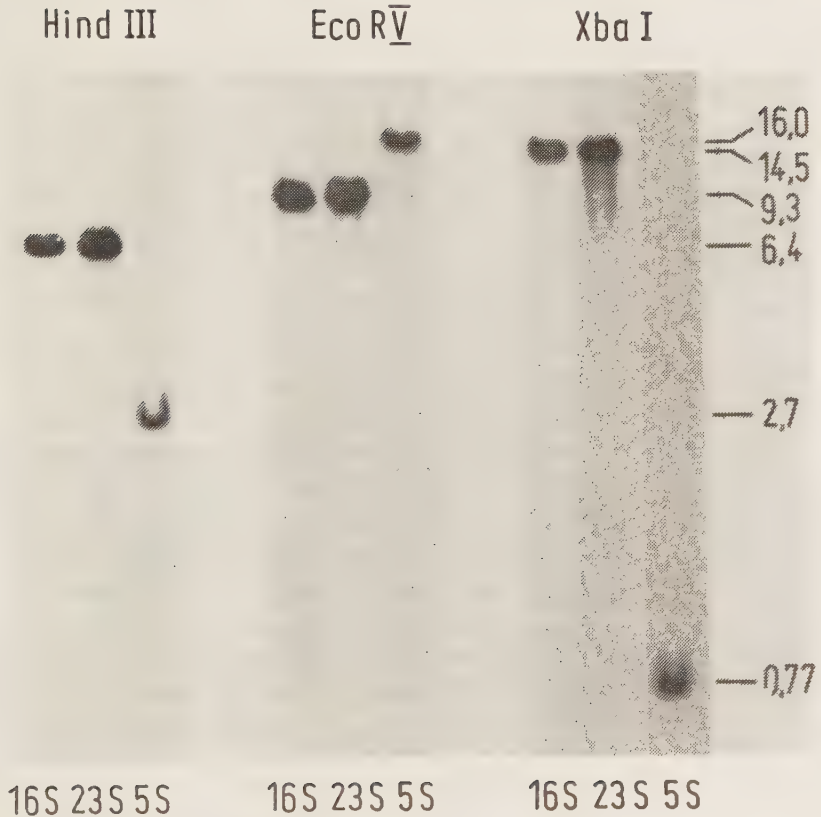


Abbildung 1. Southern-Analyse der ribosomalen RNA-Gene aus *Sulfolobus* B12.

Gesamt-DNA aus *Sulfolobus* B12 wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten. Die resultierenden Fragmente wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen. Dieses Filter wurde mit 32 P-markierten ribosomalen RNAs hybridisiert und anschließend autoradiographiert. Die über einen Größenmarker bestimmten Längen der hybridisierenden Fragmente (in Kilobasen) sind am rechten Rand angegeben.

Sequenz des 5'-Endes der reifen 23S rRNA für *Sulfolobus* nicht genau bekannt war und die vermutliche Lage dieses Endes deshalb durch Sequenzvergleich mit der 23S rRNAs aus dem verwandten Archaeobakterium *Desulfurococcus mobilis* (Leffers et al., 1987) bestimmt wurde.

Bei Verwendung der Restriktionsenzyme HindIII, EcoRV und XbaI hybridisierte 5S rRNA mit jeweils einem einzigen Fragment im genomischen Southern-Blot (Abb. 1). Die Größe dieser Fragmente entsprach nicht denjenigen, die mit 16S rRNA und 23S rRNA hybridisierten. Daraus kann geschlossen werden, daß

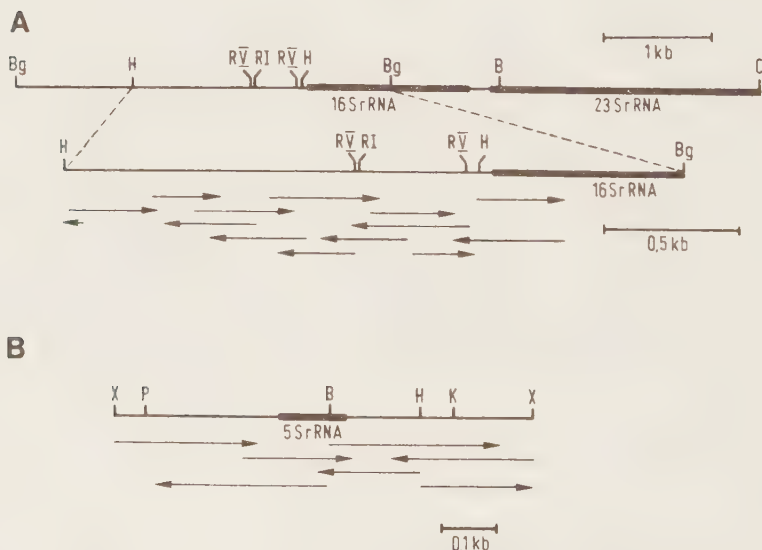


Abbildung 2. Restriktionskarte der ribosomalen RNA-Gene aus *Sulfolobus* B12 und DNA-Sequenzierungsstrategie. Die Pfeile geben Richtung und Länge der gelesenen DNA-Sequenzen an.

A. Restriktionskarte und Sequenzierungsstrategie für das 16S/23S rRNA-Operon.

B. Restriktionskarte und Sequenzierungsstrategie für ein 0,77 kb XbaI-Fragment mit dem Gen für die 5S rRNA.

Abkürzungen für Restriktionsenzyme: RI: EcoRI, RV: EcoRV, B: BamHI, Bg: BglII, C: ClaI, H: HindIII, K: KpnI, P: PstI, X: XbaI.

die 5S rRNA in *Sulfolobus* B12 von einem einzigen Gen kodiert wird und daß dieses Gen von den anderen rRNA-Genen isoliert liegt. Eine genauere Bestimmung der Mindestdistanz zwischen dem 16S/23S rRNA-Operon und dem Gen für 5S rRNA war möglich, nachdem die Gene kloniert waren und eine genaue Karte für mehrere Restriktionsenzyme vorlag (siehe unten). Das Restriktionsenzym BamHI schneidet zweimal im Bereich der rRNA-Gene: zum einen in der 23S rDNA ca. 0,1 kb vom 5'-Ende des Gens entfernt und zum anderen in der 5S rDNA ca. 30 Nukleotide vom 3'-Ende des Gens entfernt (Abb. 2). Bei der Southern-Hybridisierung von BamHI-geschnittener *Sulfolobus* B12 DNA mit einem radioaktiv markierten, 2,4 kb langen BamHI/ClaI-Fragment aus dem 23S rRNA-Gen hybridisierte ein einziges DNA-Fragment von 15 kb, während die Hybridisierung mit einer für die 5S rDNA spezifischen Probe (2,0 kb BglII-Fragment mit dem Gen etwa in der Mitte) zu zwei hybridisierenden Fragmenten von 3,3 kb bzw. 3,6 kb führte. Aus diesen Daten konnte auf einen Mindestabstand von ca. 15 kb zwischen 23S rDNA und 5S rDNA geschlossen werden. Darüber hinaus zeigte sich in einer Southern-Hybridisierung, daß 7,5 kb von zusammenhängend klonierter DNA oberhalb der 16S rDNA nicht mit der 5S rDNA-Probe hybridisierten, woraus sich ein Mindestabstand von etwa 8,5 kb zwischen den Genen für 16S rRNA und 5S rRNA ergab.

1.2. Klonierung der rRNA-Gene

Die Klonierung der rRNA-Gene ging von einer *Sulfolobus* B12-Genbank in λ EMBL4 aus, die von Wolfgang Schulz (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Die Konstruktion dieser Genbank war durch Ligation einer MboI-Partialsplattung (Fragmentgröße ca. 15-20 kb) in die BamHI-Schnittstelle des Vektors erfolgt. Von etwa 2000 Plaques dieser Genbank hybridisierten sechs mit 16S rRNA und zwei mit 5S rRNA. Von den mit 16S rRNA hybridisierenden Phagen wurden Restriktionskarten

für EcoRV, BglII, EcoRI, HindIII und ClaI angefertigt und diese mit den Ergebnissen eines mit 16S rRNA bzw. 23S rRNA hybridisierten genomischen Southern-Blots verglichen. Es zeigte sich dabei, daß fünf der sechs Phagen sowohl das 16S rRNA-Gen als auch das 23S rRNA-Gen enthielten; ein Phage enthielt nur das Gen für 16S rRNA oder einen Teil davon. Der Vergleich der Restriktionskarten der sechs Phagen ergab keine Widersprüche, was darauf hindeutete, daß in allen Fällen ein zusammenhängender Bereich kloniert worden war. Aus einem der λ -Klone wurde ein ca. 12 kb großes ClaI-Fragment in pBR322 subkloniert. Dieses Fragment reichte von einer ClaI-Schnittstelle innerhalb des 23S rRNA-Gens bis zu einer ClaI-Schnittstelle 7,5 kb oberhalb des 16S rRNA-Gens. Eine vergleichende Southern-Analyse dieses Plasmidklones (pJK1) mit chromosomaler DNA aus *Sulfolobus* B12 zeigte, daß der klonierte Bereich mit dem chromosomalen Bereich kolinear war. pJK1 diente als Ausgangsplasmid für alle nachfolgenden Restriktionskartierungen und Subklonierungen.

Im Falle der beiden mit 5S rRNA hybridisierenden Phagen wurde durch Southern-Analyse gezeigt, daß diese Phagen ein 2,0 kb BglII-Fragment und ein innerhalb dieses Fragments liegendes 0,77 kb XbaI-Fragment mit dem 5S rRNA-Gen enthielten. Fragmente identischer Größe zeigten sich im mit 5S rRNA hybridisierten genomischen Southern-Blot, so daß auch hier sichergestellt war, daß der gewünschte Bereich zusammenhängend kloniert worden war. Sowohl das BglII-Fragment als auch das XbaI-Fragment wurde in M13-Vektoren subkloniert.

1.3. DNA-Sequenzanalyse im Bereich des Gens für 16S rRNA

Der gesamte Bereich zwischen einer ApaI-Schnittstelle im 16S rRNA-Gen und einer HindIII-Schnittstelle 1,86 kb oberhalb davon wurde sequenziert, um die Voraussetzungen für eine exakte Kartierung des Primärtranskripts zu schaffen.

Mit Ausnahme eines Bereiches von ca. 300 Basen anschließend an die HindIII-Schnittstelle wurde die Sequenz von beiden Strängen gelesen (Abb. 2). Das 5'-Ende des Gens für 16S rRNA wurde durch Vergleich mit der entsprechenden Sequenz aus *Sulfolobus solfataricus* (Olsen et al., 1985) festgelegt. Innerhalb des sequenzierten Bereichs der 16S rDNA (272 Nukleotide) betrug die Homologie zwischen *Sulfolobus* B12 und *Sulfolobus solfataricus* 86%.

1.4. Kartierung des Transkriptionsstarts für das 16S/23S rRNA-Operon

Die enge Nachbarschaft zwischen 16S rDNA und 23S rDNA in *Sulfolobus* B12 legte die Annahme nahe, daß wie bei allen anderen Organismen (mit Ausnahme von *Thermoplasma acidophilum*, siehe Tu & Zillig, 1982) die beiden Gene kotranskribiert werden. Dementsprechend wurde nur die Region oberhalb des 16S rRNA-Gens auf die Lage eines Transkriptionsstarts hin untersucht. Das zur Primer-Extensions-Analyse bzw. zur Gewinnung einer endmarkierten S1-Probe verwendete Oligonukleotid schloß mit seinem 5'-Ende direkt an das 16S rRNA-Gen an, so daß die Länge der cDNA bzw. des vor S1-Abbau geschützten DNA-Fragments direkt die Entfernung des Transkriptstarts vom 16S rRNA-Gen angeben sollte. Für die beiden Hauptfragmente nach S1-Abbau ergaben sich Längen von 140 und 141 Nukleotiden und die größte cDNA-Spezies war 139 Nukleotide lang (Abb. 3). Bei der Primer-Extensions-Analyse wurden zahlreiche kürzere Fragmente beobachtet, die zum Teil in großer Menge vorlagen, aber keine Entsprechung in der S1-Analyse hatten (Abb. 3). Sie waren vermutlich durch vorzeitige Kettenabbrüche bedingt, deren Ursache stabile Sekundärstrukturen innerhalb der RNA sein könnten. Wegen der größeren Präzision der Primer-Extensions-Analyse im Vergleich zur S1-Kartierung wurde die 139 Nukleotide lange cDNA als genaues Maß für das 5'-Ende einer prä-rRNA angesehen, was dem Guaninrest innerhalb einer Sequenz TGC

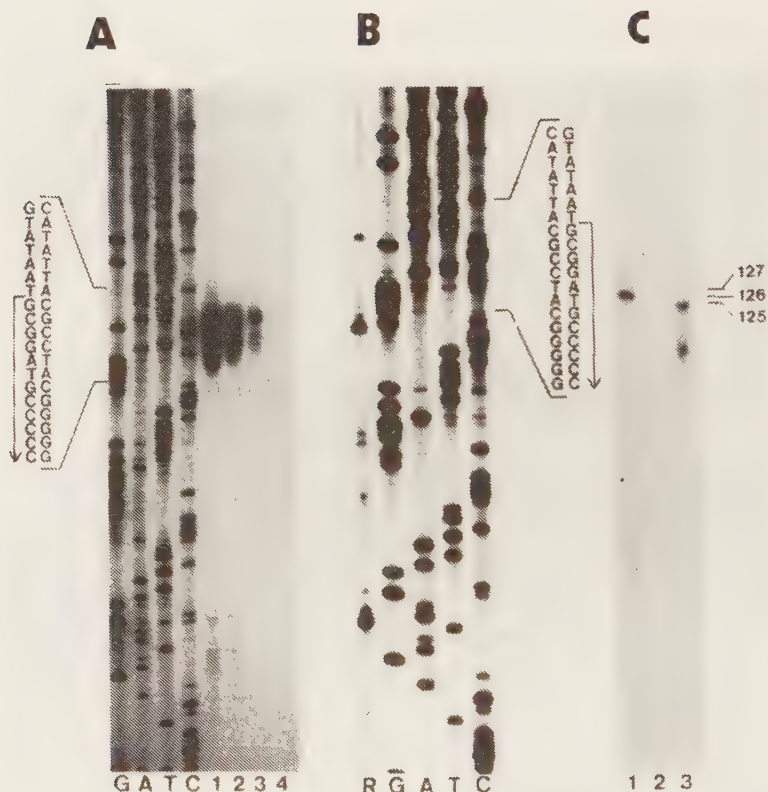


Abbildung 3. Bestimmung der Transkriptionsstarts für die rRNA-Gene aus *Sulfolobus* B12.

Das für die Sequenzreaktion (Spuren G,A,T,C) eingesetzte Oligonukleotid d(TGGGGGTAGGAAGCTAA) war identisch mit demjenigen, das zur Primer-Extensions-Analyse und zur Synthese einer S1-Probe verwendet wurde. Die für die Kartierungen verwendete Gesamt-RNA stammte aus logarithmisch wachsenden *Sulfolobus*-Zellen ($OD_{600}=0,03$).

A. S1-Analyse des Primärtranskripts für das 16S/23S rRNA-Operon. Es wurden jeweils 30000 cpm 5'-markierte DNA und folgende Mengen an *Sulfolobus* B12 RNA eingesetzt: Spur 1: 32 µg, Spur 2: 8 µg, Spur 3: 1,4 µg, Spur 4: Kontrolle (keine *Sulfolobus*-RNA zugegeben).

B. Primer-Extensions-Analyse des 16S/23S rRNA-Primärtranskripts. Die 5'-markierte cDNA ist in der Spur "R" gezeigt.

C. Elektrophoretische Analyse von 5S rRNA aus *Sulfolobus* B12 nach Inkubation mit Vaccinia-Virus-Guanylyltransferase und [α - 32 P]GTP. Spur 1: 0,1 µg RNA direkt aufgetragen; Spur 2: 1,2 µg RNA nach Hybridisierung mit dem nicht-kodierenden Strang des 5S rRNA-Gens und anschließendem S1-Abbau; Spur 3: Wie Spur 2, jedoch unter Verwendung des zur 5S rRNA komplementären Strangs des Gens.

entspricht (Abb. 4). Da mit keiner der beiden Analysemethoden größere Fragmente erhalten wurden, ist es sehr wahrscheinlich, daß dieses 5'-Ende dem Transkriptionsstart entspricht. Der Vergleich der Sequenz in der Umgebung dieses Transkriptionsstarts mit vermutlichen Promotersequenzen in anderen Archaeobakterien zeigte eine sehr große Ähnlichkeit mit der von Wich et al. (1986) beschriebenen Promotersequenz für die Expression stabiler RNA-Gene in *Methanococcus vannielii*. Neben der den Transkriptionsstart enthaltenden "Box B" TGC wurde in der zu erwartenden Distanz vom Transkriptionsstart eine AT-reiche Sequenz gefunden (TTTATATG), die mit einem Teil des für *Methanococcus vannielii* beschriebenen "Box A"-Promoterelements nahezu identisch war.

	<u>HinfI</u>	
1	CTAAAGAGAATCATAAACGACCTCACAAAGAGAAAACTAACATCTTCTCAAACAACCTGT	60
61	TGAAATACATAGCAGAAGTCCTAAACGCAGAGTACACATATTACGACGGAATGTCCTATC	120
121	ACAAGACTGGTGAGATGAAGACTAATAACGCAATACTCTTCATGTGCTCAGAACTACTTG	180
181	AAAACACCTTTTGGCGATTACATAAGATATCCAGTACCGGAATTCACCCCAAGATGAGAGG	240
241	TGTGAATTATTAGACGCTAGGTACATTAACGATGTGTGCTTTATGTAAATCCTGCAATT	300
301	AAGTCACAATAATTCAGTAGACAAAAATTCTAGTCTTCCCTTGAAAGGTGATTAGAAAAA	360
361	CTTGTCTTTATGAGACTTCTTTCGATTTTCTTTTAAAGTTGAATAGTATATATATA	420
421	ATTAACGTGTAAATCAAAAAGAGGTTTAAACACATAAGAATTATTACGAACTAAAACAC	480
481	<u>TCTTATATTATTAACGCACGTTATTCTCCCTTAATTTACACGGAATATAGAAGTTAGA</u>	540
541	<u>TTTATATGGGATTTCAGAACAAATATGTATAAT</u> ^{Start of transcription} <u>TCGGATGCCCCCGGGAGAAACACTCC</u>	600
601	CGCCGGGGAAGATATCGCTTATTCGTGGAGGGCAAGATCCCCGGGCCCTTAAGCCCGGG	660
661	AAGCTTGCTCTGACAAGGGAACCAAGGGTGTGGTTAGCTTCTCAACCCCA <u>ATCCGGTT</u>	720
	16S rRNA	

Abbildung 4. DNA-Sequenz oberhalb des Gens für die 16S rRNA aus *Sulfolobus* B12.

Die HinfI-Schnittstelle am Beginn der gezeigten Sequenz entspricht dem 3'-Ende der zur S1-Kartierung eingesetzten DNA-Probe. Der 5'-terminale Bereich des Gens für 16S rRNA ist umrandet. Vermutliche Promoterelemente sind unterstrichen.

1.5. DNA-Sequenzanalyse im Bereich des Gens für 5S rRNA

Um das Gen für 5S rRNA zu lokalisieren, wurde die DNA-Sequenz des 0,77 kb XbaI-Fragmentes bestimmt, das bei der Southern-Analyse mit 5S rRNA hybridisiert hatte. Der Vergleich dieser Sequenz mit derjenigen der 5S rRNA aus *Sulfolobus acidocaldarius* (Stahl et al., 1981) zeigte, daß das Gen etwa in der Mitte dieses Fragments lag (Abb. 2 und Abb. 5). Mit Ausnahme von drei Positionen waren die Sequenzen der 5S rRNAs aus *Sulfolobus* B12 und *Sulfolobus acidocaldarius* identisch (Abb. 5). Obwohl die drei Nukleotidaustausche alle im Bereich von Sekundärstrukturen lagen, gab es keine Veränderung in der Möglichkeit zur Basenpaarung, da in allen drei Fällen Transitionen vorlagen, die den Austausch von zwei GU-Paaren (*S. acidocaldarius*) durch GC-Paare (*Sulfolobus* B12) bzw. von einem AU-Paar (*Sulfolobus acidocaldarius*) durch ein GU-Paar (*Sulfolobus* B12) bewirkten. Eine computer-unterstützte Auswertung der Sequenz des 0,77 kb XbaI-Fragmentes ergab, daß sich innerhalb des sequenzierten Bereichs keine tRNA-Gene befinden, so daß das 5S rRNA-Gen offenbar keinen anderen stabilen RNA-Genen benachbart ist. Es zeigte sich jedoch, daß unterhalb des 5S rRNA-Gens ein offener Leserahmen (ORF(5S)) beginnt, dessen Ende außerhalb dieses Fragments liegt. Um zusätzliche Sequenzinformationen über dieses hypothetische Protein zu erhalten, wurde die DNA-Sequenzierung bis zu einer 0,8 kb 3' vom 5S rRNA-Gen liegenden BglII-Schnittstelle hin ausgeweitet. Der Leserahmen endete auch innerhalb dieses Bereichs nicht und hatte eine Mindestlänge von 261 Aminosäuren (Abb. 5). Der Sequenzvergleich dieses hypothetischen Proteins mit der Datenbank der National Biomedical Research Foundation ergab keine auffallende Homologie mit bekannten Proteinen.

```

1  TCTAGAAAGAACTAAACCTGGAGATATAGTAGTAGTAGTAGGGAATACTGCAGGGTGGCTCAATAAATGTCCCT
81  CTAATCAACAACAACTGTAAACGTTTACACTGTGATTAAAGTCGTTAATGAGACATGAAACGGAGAGACCTTTCCAA
161  GATGGAGATTATGTTCTTAAAGTAGTTGGCACTGTGCCAAGGATGGACGTAACTATATATAGTAGGTATATACGCAGT
241  GGTGCCTGAGGAAAAGAAGGGTAGTTAATTTTATATGTTATGAGTACTTAATTTTCCCACCCGGCCACAGTGAGC
                                     GCCCACCCGGTCACAGTGAGC
321  GGGCAACACCCGGACTCATTTCGAACCCGGAAGTTAAGCCGCTCACGTTGGTGGGCGGTGGATACCGTGAGGATCCGCA
                                     GGGCAACACCCGGACTCATTTCGAACCCGGAAGTTAAGCCGCTCACGTTAGTGGGCGGTGGATACCGTGAGGATCCGCA
401  GCCCCACTAAGCTGGGATGGGCTTTTATATTTCTCTGATTTTAAAGATTACTCTGAGTTGAATGAAGAAAGTATATGATGA
                                     M K K V Y D E
                                     GCCCCACTAAGCTGGGATGGGTTTT
481  GATTTATGCCTATATTAACTTGATGATAGAGAAGCCAAGATAATAGATATGCCTGAGTTTCAGCGCCTAAGGAGAATAA
   I Y A Y I K L D D R E A K I I D M P E F Q R L R R I K
561  AACAGACAAGCTTAGCATACTTGGTATATCCTGGTGCTACTCACACTAGATTAGCCACTCATTAGGTACCTTTATCTCT
   Q T S L A Y L V Y P G A T H T R F S H S L G L S T F Y L
641  ACTACAATTTTAGGTGAGAAATCAACAATTAGGAATAATAACTGATGAAGAGTCAACCTATCTAAAGTACTCTGCATT
   T T I L G E R F K Q L G I I T D E E S T Y L K Y S A L
721  ACTCCACGATATAGGTCAATTTCTCTTTAGTCATAGTCTCGAGCCTCTATATCTAGAAAAAGGATTTCAATAAGGATT
   L H D I G Q F P F S H S L E P L Y L E K G L S N K D L
801  TAAGATATATGATAATTTCCAAGTCCCCTTACTTTAGGGATTTTTTGTATAAGAGTCAATTGACTACAATAAGATTCTA
   R Y M I I S K S P Y F R D F F D K E S I D Y N K I L
881  GATATTTTAAATGGAAATCTATGATTTTCATCAATTATAAACAGTGACGATAGTTGTGATAGGATGGGATATCTAGTTAG
   D I L N G N S M I S S I N S D V D V D R M D S Y L V R
961  AGATTCGAGACACACGAGGTGCAACTAGGCAATATTGATTATATAGACTTCTAGATACTATCTTTTATGGAATAATA
   D S R H T G V Q L G N I D L Y R L L D T I F Y G N N N
1041  ACGAAATTTATGTCACGAGATAAAGGCATATACAGTTTAGAGAACTTTTTCATATCCAGGCTTCACATGTATCAAGCTGA
   E I I V Q D K G I Y S L E N F I S R L H M Y Q A V
1121  TATTATCATAAGACGATAATAGTTATGAGTTAATGCTGAGAGAAATTTTAGAACTATTCTATGATGCTGTGATTGCTG
   Y Y H K T I I G Y E L M L R E I F R T I H D C C D S S
1201  AATTTTAAGCGTTGATAATTTAAGAGATCT 1230
   I L S V D N L R D

```

Abbildung 5. DNA-Sequenz im Bereich des 5S rRNA-Gens aus *Sulfolobus* B12.

Die gezeigte Sequenz erstreckt sich von einer XbaI-Schnittstelle 296 Nukleotide oberhalb des 5S rRNA-Gens bis zu einer BglII-Schnittstelle 802 Nukleotide unterhalb dieses Gens. Die 5S rDNA beginnt bei Position 300; die Lage des Gens ist durch Vergleich mit der 5S rRNA aus *Sulfolobus acidocaldarius* (untere Sequenz) ersichtlich. Die zu einem offenen Leserahmen gehörende Aminosäuresequenz ist unterhalb der DNA-Sequenz angegeben; der Leserahmen endet innerhalb des sequenzierten Bereichs nicht. Die hypothetische Ribosomenbindungsstelle für die Translation dieses Leserahmens ist durch ausgefüllte Kreise oberhalb der DNA-Sequenz angegeben. Transkriptionsstarts sind durch Pfeile markiert und vermutliche Promotersequenzen sind unterstrichen.

1.6. Identifizierung des Transkriptionsstarts für das 5S rRNA-Gen

Das 5'-Ende der reifen 5S rRNA kartiert auf dem Guaninrest innerhalb einer Sequenz TGC (Abb. 5). Zwanzig Nukleotide oberhalb dieses 5'-Endes tritt die Oktanukleotidsequenz TTTATATG auf, die in ähnlichem Abstand vom Transkriptionsstart auch für das 16S rRNA-Gen gefunden wurde (Abb. 4). Zudem gibt es 51 Nukleotide (5S rDNA) bzw. 52 Nukleotide (16S/23S rDNA) oberhalb dieser Oktanukleotidsequenz eine sieben Nukleotide lange, zwischen beiden Genen vollständig konservierte Sequenz CTTATAT (Abb. 6). Diese Ähnlichkeiten zwischen den DNA-Sequenzen legten die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um Promoterelemente handelt und daß die Transkription des 5S rRNA-Gens direkt mit dem 5'-Ende der reifen RNA beginnt. Um die Richtigkeit dieser Hypothese zu überprüfen, wurde versucht, aus Ribosomen isolierte 5S rRNA durch Inkubation mit [α -³²P]GTP und Vaccinia-Virus-Guanylyltransferase zu markieren und damit die Anwesenheit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende der RNA zu demonstrieren. Die Bestimmung säurefällbarer Radioaktivität deutete darauf hin, daß die 5S rRNA mit einer Effizienz von 1,8% markiert worden war, wobei Markierungseffizienzen von ca. 15% für mRNAs typisch sind (DasSarma *et al.*, 1984). Beim Auftrag dieser RNA auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel zeigte sich eine radioaktive Hauptbande mit einer Länge von etwa 126 Nukleotiden sowie zwei weitere

5S rRNA:	CTTATAT--49b--TTTTTATATGTGTTATGAGTAC...TTAATTTTGCCAC	↓
	*****	***** * * * * *
16S/23S rRNA:	CTTATAT--50b--GATTATATGGGATTCAGAACAATATGTATAATGCGGAT	↑

Abbildung 6. Vergleich der DNA-Sequenzen im Bereich der Transkriptionsstarts der rRNA-Gene. Identische Nukleotide sind durch Sterne markiert und Pfeile geben die Transkriptionsstarts an.

Banden mit Längen von etwa 125 und 127 Nukleotiden (Abb. 3). Dies entspricht der Größe der 5S rRNA, wobei das Auftreten mehrerer Banden vermutlich durch eine Längenheterogenität am 3'-Ende bedingt ist (Stahl *et al.*, 1981; Dams *et al.*, 1983). Da angesichts der geringen Markierungseffizienz nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, daß statt der 5S rRNA eine Verunreinigung gleicher Größe markiert worden war, wurde die markierte RNA mit dem nicht-kodierenden Strang des Gens bzw. dem entsprechenden Gegenstrang (beide kloniert in M13-Vektoren) hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Die Analyse der Abbauprodukte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel zeigte, daß die RNA wie erwartet nur durch den zur 5S rRNA komplementären Strang vor Abbau geschützt wurde (Abb. 3). Die geringe Markierungseffizienz ist möglicherweise dadurch bedingt, daß das 5'-Ende der 5S rRNA in einem Bereich stabiler Sekundärstruktur verborgen liegt (Stahl *et al.*, 1981; Dams *et al.*, 1983).

1.7. Kartierung des Transkriptionsstarts für den Leserahmen ORF(5S)

Ebenso wie für das 5S rRNA-Gen selbst, wurde auch für den sich unmittelbar daran anschließenden Leserahmen ORF(5S) die vermutliche Lage eines Promoters durch DNA-Sequenzvergleich mit den bereits bekannten Promotersequenzen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die beiden letzten Nukleotide des 5S rRNA-Gens das 5'-Ende der Sequenz TTTATA bilden (Abb. 5), die ein typisches "Box A"-Element darstellt. 23 Nukleotide unterhalb dieser Sequenz fand sich das Trinukleotid TGA (Abb. 5), das bei den meisten SSV1-Transkripten in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts auftritt (siehe Abschnitt 2.8.) und vermutlich ein "Box B"-Element insbesondere für Proteingene darstellt. Im Falle von ORF(5S) lag diese TGA-Sequenz fünf Nukleotide oberhalb des Beginns des offenen Leserahmens (Abb. 5). Um zu überprüfen, ob diese

Sequenzen tatsächlich mit dem 5'-Ende einer RNA korrelieren, wurde für diesen Bereich eine S1-Kartierung und eine Primer-Extensions-Analyse durchgeführt (Abb. 7). Mit beiden Methoden wurde gefunden, daß tatsächlich das 5'-Ende einer RNA im Bereich des TGA-Trinukleotids kartiert. Während die S1-Kartierung wie üblich eine kurze Leiter von Fragmenten ergab, konnte aufgrund der Primer-Extensions-Analyse präzise auf den G-Rest in der Mitte der Trinukleotidsequenz TGA als 5'-Ende einer RNA geschlossen werden (Abb. 7). Bei der S1-Analyse wurde ein Teil des als Probe eingesetzten DNA-Fragments in seiner gesamten Länge vor Abbau geschützt (Abb. 7). Da das 3'-Ende dieser DNA-Probe innerhalb des 5S rRNA-Gens lag, kann dieses Ergebnis als "Durchlesen" des 5S rDNA-Terminators interpretiert werden. Bei der Primer-Extensions-Analyse wurden neben einer 96 Nukleotide langen cDNA, die dem S1-kartierten Transkriptionsstart oberhalb von ORF(5S) entsprach, auch zwei cDNAs von 127 und 128 Nukleotiden Länge beobachtet (Abb. 7), die den Positionen C_{123} bzw. T_{124} des 5S rRNA-Gens entsprachen. C_{123} ist vom 3'-Ende her betrachtet das erste Nukleotid der 5S rRNA, das in einem Sekundärstrukturbereich liegt. Dementsprechend rührt die cDNA-Doppelbande vermutlich von der reversen Transkription eines 5S rRNA/ORF(5S)-Fusionstranskripts her, wobei die cDNA-Synthese offenbar beim Auftreffen des Enzyms auf die sehr stabile Sekundärstruktur der 5S rRNA abbricht. Diese Interpretation wird durch die Tatsache gestützt, daß bei der S1-Kartierung keine diesen cDNAs entsprechenden Fragmente auftraten (Abb. 7).

Die Analyse der Nukleotidsequenz am 5'-Ende des ORF(5S)-Transkripts zeigte, daß die ersten sieben Nukleotide von einer Fehlpaarung abgesehen eine ideale Ribosomenbindungsstelle ergeben, welche unmittelbar vor dem Initiationskodon des offenen Leserahmens liegt (Abb. 5). Ähnliche Abstände zwischen vermutlichen Ribosomenbindungsstellen und den zugehörigen Initiationskodons wurden bei der Analyse von SSV1-Genen gefunden (siehe Abschnitt V.7.), so daß die

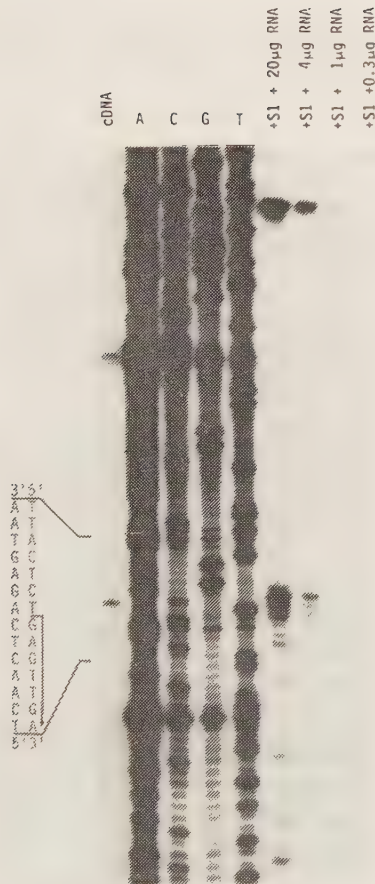


Abbildung 7. S1-Nuklease- und Primer-Extensions-Kartierung des Transkriptionsstarts oberhalb von ORF(5S). Das 5'-Ende des für beide Kartierungen verwendeten Oligonukleotids d(AGGCGCTGAAACTCAGG) lag 124 Nukleotide unterhalb des Gens für 5S rRNA (zur Nukleinsäuresequenz dieses Bereichs siehe Abb. 5). Das 3'-Ende der zur S1-Kartierung verwendeten Probe entsprach der BamHI-Schnittstelle innerhalb der 5S rDNA (Abb. 2). Im Falle der S1-Kartierung wurden 15000 cpm DNA-Probe mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Bei der Primer-Extensions-Analyse wurde der Gesamtansatz in der Spur "cdna" aufgetragen. Spuren A,C,G,T: Sequenzreaktion unter Verwendung des für die Kartierungen benützten Oligonukleotids.

Anwesenheit dieser Sequenz auf dem ORF(5S)-Transkript stark auf eine Expression des hypothetischen Proteins *in vivo* hindeutet.

2. Transkription von SSV1

2.1. Identifizierung und Kartierung der SSV1-Transkripte durch Northern-Analyse

Um einen Überblick über die Transkription der SSV1-DNA zu erhalten, wurde zunächst Gesamt-RNA aus *Sulfolobus* B12 durch Northern-Hybridisierung untersucht. Die dazu verwendete RNA stammte aus Zellen, die acht Stunden zuvor UV-bestrahlt worden waren. Als Proben für diese Analyse wurden zunächst Gesamt-SSV1-DNA sowie deren vier EcoRI-Fragmente verwendet (Abb. 8). Es konnten dabei acht verschiedene RNAs unterschieden werden, die als Transkripte T1 bis T8 bezeichnet wurden. Die Längen dieser Transkripte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Zur genaueren Kartierung dieser RNAs wurden kurze einzelsträngige DNA-Proben verwendet, die durch Klonierung der SSV1-DNA in M13-Vektoren erhalten worden waren. Einige dieser Klone enthielten definierte Restriktionsfragmente, während die meisten auf ungezielte Klonierung von SSV1-DNA zurückgingen. Die SSV1-DNA war zu diesem Zweck durch Ultraschallbehandlung fragmentiert worden. Alle diese M13-Klone stammten von Peter Palm und Bernd Grampp aus diesem Labor und waren zum Zwecke der DNA-Sequenzierung präpariert worden. Da die Insertgröße in der Regel nicht bekannt war, wurde sie durch Restriktionsanalyse der replikativen Form bestimmt. Die Lage der 3'-Enden der Insert-DNAs sowie die Strangspezifität waren aufgrund der mit Hilfe dieser Klone gelesenen DNA-Sequenzen bekannt. Insgesamt wurden etwa 50 verschiedene Einzelstrang-DNAs als Proben für die Northern-Analyse verwendet. Die

Positionen der für die Kartierung wichtigen Klone auf dem SSV1-Genom sind in Abb. 8 gezeigt. Neben dem Auftreten oder der Abwesenheit von Hybridisierungen wurden auch relative Hybridisierungsintensitäten einer bestimmten RNA mit zwei verschiedenen DNA-Proben zur Kartierung herangezogen. In diesen Fällen wurde durch die Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität sichergestellt, daß die spezifischen Radioaktivitäten der verwendeten Proben ausreichend ähnlich waren, um sichere Schlüsse zuzulassen.

Die Lage der Transkripte T1 und T2 ergab sich aus ihrer Hybridisierung mit Klon E2 und den strangspezifischen Klonen M28 und M29 (Abb. 8). Während beide Transkripte deutlich mit Klon M28 hybridisierten, zeigte sich im Falle von Klon M29 zwar eine starke Hybridisierung mit Transkript T2 aber nur eine schwache Hybridisierung mit Transkript T1 (Abb. 8). Bei Berücksichtigung der Längen von T1 und T2 (0,5 kb bzw. 1,0 kb) wurde aus diesen Hybridisierungsdaten geschlossen, daß beide Transkripte am gleichen Punkt starten und sich lediglich durch die Lage ihres 3'-Endes voneinander unterscheiden. Diese Schlußfolgerung wurde anschließend durch S1-Kartierung und Primer-Extensions-Analyse bestätigt (siehe Abschnitt 2.6.1.) Diese genauen Kartierungsdaten zeigten, daß das Transkript T1 in seiner Position auf dem SSV1-Genom nicht mit dem Klon M29 überlappt, obwohl bei der Northern-Analyse eine schwache Hybridisierung dieser RNA mit

Tabelle 1: Längen von SSV1-Transkripten (in Kilobasen)

T1: 0,5	T6: 2,15
T2: 1,0	T7: 3,85
T3: 0,9	T8: 4,4
T4: 2,65	T _{ind} : 0,28
T5: 3,0	

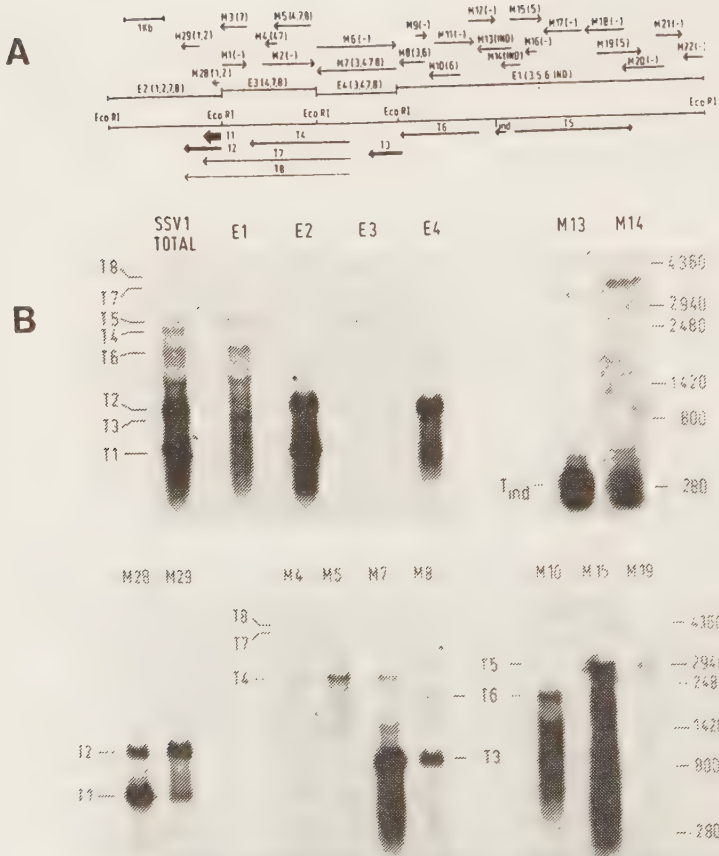


Abbildung 8. Kartierung von SSV1-Transkripten über Northern-Analyse.

A. Strategie der Kartierung. Die Lage und Strangspezifität der verwendeten M13-Klone (M1 bis M22 sowie M28 und M29) und die Lage von EcoRI-Plasmidklonen (E1 bis E4) ist oberhalb der EcoRI-Restriktionskarte von SSV1 angegeben. Für jeden der Klone ist in Klammern angegeben, mit welchen SSV1-Transkripten (wenn überhaupt) eine Hybridisierung beobachtet wurde. Unterhalb der EcoRI-Restriktionskarte sind die sich daraus ergebenden Positionen der SSV1-Transkripte eingezeichnet. Die Ergebnisse der S1- und der Primer-Extensions-Kartierung sind dabei bereits berücksichtigt.

B. Autoradiographien von Northern-Filtern. Oberhalb der Spuren sind die als Proben benutzten M13- oder Plasmidklone angegeben. Die am rechten Rand angegebenen Längen (in Nukleotiden) entsprechen DNA-Größenmarkern.

der Probe M29 beobachtet worden war (Abb. 8). Im Bereich des Klon M29 liegt jedoch eine 61 Basenpaare lange Sequenz, die sich 284 Nukleotide weiter oberhalb im Bereich von T1 exakt wiederfindet. Dementsprechend ist eine Hybridisierung von T1 mit Klon M29 auch bei fehlender Überlappung der Kartenpositionen zu erwarten.

Die Kartierung des Transkripts T3 basiert auf der starken Hybridisierung dieser RNA mit den Klonen E4 und M7 und der schwachen Hybridisierung mit den Klonen E1 und M8 (Abb. 8). Transkript T3 ist 0,9 kb lang (Tabelle 1) und liegt ungefähr in der gleichen Menge vor wie T2.

Transkript T4 kommt in den Zellen nur in verhältnismäßig geringer Menge vor und ist etwa 2,65 kb lang (Tabelle 1). Sein 5'-Ende liegt 3,3 kb oberhalb von T1 und T2. Die Kartierung von T4 stützt sich darauf, daß dieses Transkript mit den Klonen M4 und M7, jedoch nicht mit M3 hybridisierte (Abb. 8). Alle mit T4 hybridisierenden Klone hybridisierten auch mit den in sehr geringer Menge vorliegenden Transkripten T7 und T8, während Klon E2 schwach mit T7 und T8, jedoch nicht mit T4 hybridisierte. Wegen zu geringer Empfindlichkeit war die Hybridisierung von Klon E2 mit den Transkripten T7 und T8 bei Verwendung von RNA 8 Stunden nach UV-Induktion nicht nachweisbar. Eine solche Hybridisierung zeigte sich jedoch mit RNA, die aus Zellen 24 Stunden nach UV-Induktion gewonnen worden war, da die Menge an SSV1-RNAs zu diesem Zeitpunkt besonders hoch war (Daten nicht gezeigt). Das Hybridisierungsmuster von T4, T7 und T8 legt die Vermutung nahe, daß alle drei Transkripte ein gemeinsames 5'-Ende besitzen und sich nur in der Lage ihres 3'-Endes voneinander unterscheiden. Unter Berücksichtigung dieser Annahme ergibt sich aus den gemessenen Längen von T7 und T8 (3,85 kb bzw. 4,4 kb), daß T7 an der gleichen Stelle terminiert wie T1 und daß T8 an der gleichen Stelle terminiert wie T2 (Abb. 8).

Die RNAs T5 und T6 scheinen in erheblichem Umfang einem Abbau vom 3'-Ende her zu unterliegen. Dies ergibt sich daraus, daß DNA-Proben, die im Bereich der 3'-Enden dieser Transkripte kartieren (M19 im Falle von T5 und M8 im Falle von T6) im Wesentlichen eine einzige Bande ergaben, die den Transkripten voller Länge entsprach (Abb. 8). Bei Verwendung von Proben im 5'-Bereich von T5 und T6 (M15 im Falle von T5 und M10 im Falle von T6) zeigte sich hingegen zusätzlich ein Kontinuum von kürzeren hybridisierenden RNAs (Abb. 8). Obwohl diese Beobachtung unter anderem auch durch vorzeitige Termination der Transkription erklärt werden kann, läßt das Fehlen definierter Banden eher vermuten, daß beide RNAs *in vivo* rasch abgebaut werden. Die Kartierung von T5 gründet sich auf dessen Hybridisierung mit den Klonen M15 und M19 und der fehlenden Hybridisierung mit M12 und M21 (Abb. 8). Das Transkript T6 hybridisierte mit M8 und M10, nicht hingegen mit M7 und M13 (Abb. 8). Da der Abstand zwischen den nicht-hybridisierenden flankierenden Klonen M7 und M13 mit der Länge von T6 identisch war (Tabelle 1), konnte dieses Transkript allein durch Northern-Analyse verhältnismäßig genau kartiert werden.

2.2. Konstitutive Expression von SSV1-Transkripten

Die Transkripte T1 bis T8 wurden nicht nur in UV-induzierten Zellen gefunden, sondern sie lagen auch in nicht-induzierten Zellen in merklichem Umfang vor (Abb. 9). Alle diese RNAs können demnach als konstitutiv angesehen werden. Die Menge dieser RNAs in nicht-induzierten Zellen hing von der Wachstumsphase der Kultur ab; sie war in exponentiell wachsenden Kulturen ($OD_{600}=0,03$) am höchsten und war in dichter gewachsenen Kulturen ($OD_{600}=0,4$) stark reduziert (Abb. 9). Diese Beobachtung könnte durch eine generelle wachstumsphasenabhängige Transkriptionskontrolle erklärt werden. In Kulturen, die sich nahe der stationären Phase befanden ($OD_{600}=1,2$), nahm die Menge an konstitutiven

SSV1-RNAs wieder zu (Abb. 9). Dieser Anstieg der SSV1-Transkription korrelierte in etwa mit der Gendosis, da sehr dicht gewachsene Kulturen eine um den Faktor 2-5 höhere Kopienzahl des SSV1-Genoms aufwiesen als Kulturen mit einer OD_{600} um 0,4. *Sulfolobus* B12 Kulturen, die sich kurz vor der stationären Phase befanden, zeigten zudem eine vergleichsweise hohe Rate an spontaner SSV1-Freisetzung (ca. 5×10^8 Partikel pro Milliliter) und waren optimal UV-induzierbar. Die Kulturen wurden in der Regel bei einer OD_{600} von 1,6-2,0 stationär.

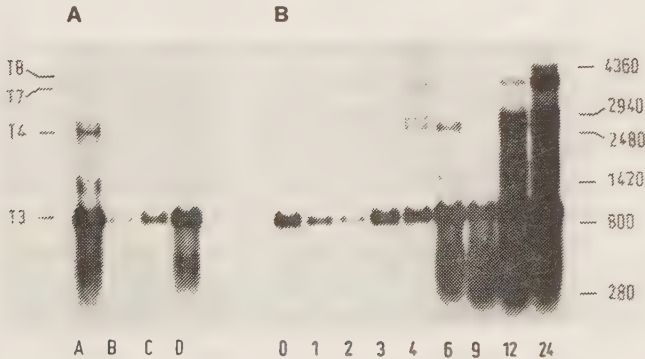


Abbildung 9. Expression konstitutiver SSV1-Transkripte in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und nach UV-Bestrahlung. Als repräsentatives Beispiel ist die Autoradiographie eines mit der Probe E4 (siehe Abb. 8A) hybridisierten Northern-Filters gezeigt, wodurch die Transkripte T3, T4, T7 und T8 erkennbar werden. Die Zahlen am rechten Rand geben die Längen (in Nukleotiden) von DNA-Größenmarkern an.

A. Abhängigkeit von der Wachstumsphase. RNA wurde dazu aus Kulturen folgender Zelldichten gewonnen (OD_{600} -Werte): Spur A: 0,03, Spur B: 0,4, Spur C: 1,2; Spur D: Zellen acht Stunden nach UV-Bestrahlung zum Vergleich.

B. Abhängigkeit der Menge konstitutiver Transkripte von der Zeit (in Stunden) nach UV-Bestrahlung.

2.3. Transkription von SSV1 nach UV-Bestrahlung

In den ersten beiden Stunden nach UV-Bestrahlung nahm die Menge aller konstitutiven SSV1-Transkripte deutlich ab (Abb. 9), was vermutlich dadurch bedingt war, daß die Kultur zur Bestrahlung von 80°C auf Raumtemperatur abgekühlt worden war und sich die Zellen von diesem Temperaturschock erholen mußten. Anschließend nahm die Menge an konstitutiven Transkripten wieder zu und erreichte nach 12-24 Stunden Werte, die weit über dem Niveau vor der UV-Bestrahlung lagen (Abb. 9). Es handelte sich dabei aber vermutlich nicht um eine Induktion der Transkription, sondern eher um einen Gendosisseffekt, da ab 3 Stunden nach UV-Bestrahlung eine massive Replikation der SSV1-DNA einsetzte. Zusätzlich zu den konstitutiven Transkripten, die nach UV-Bestrahlung in ihrer Expression alle den gleichen Zeitverlauf zeigten, trat auch ein Transkript von ca. 0,3 kb (T_{ind}) auf, das nur zwischen 2 und 6 Stunden nach UV-Bestrahlung in merklicher Menge vorhanden war (Abb. 10). In nicht-induzierten Zellen war T_{ind} über Northern-Analyse nicht nachweisbar. In Analogie zu den konstitutiven RNAs wurde auch T_{ind} mit Hilfe strangspezifischer DNA-Proben kartiert, wobei RNA aus solchen Zellen verwendet wurde, die drei Stunden nach UV-Bestrahlung geerntet worden waren. T_{ind} hybridisierte stark mit dem Klon M13 und deutlich schwächer mit Klon M14 (Abb. 8). Diese Hybridisierungen ließen eine Kartierung mit einer Ungenauigkeit von etwa 150 Nukleotiden zu. Neben der Hauptbande von etwa 0,3 kb wurde bei der Hybridisierung mit den Klonen M13 und M14 noch eine weitere hybridisierende RNA von ca. 0,2 kb Länge beobachtet, die nach UV-Bestrahlung mit einem ähnlichen Zeitverlauf wie die Hauptspezies von T_{ind} exprimiert wurde (Abb. 8 und Abb. 10). Da dieses kleinere Transkript deutlich mit der im 5'-Bereich von T_{ind} kartierenden Probe M14 hybridisierte (Abb. 8), ist anzunehmen, daß beide T_{ind} -Spezies ein gemeinsames 5'-Ende besitzen und sich lediglich in der Position ihres 3'-Endes voneinander unterscheiden.

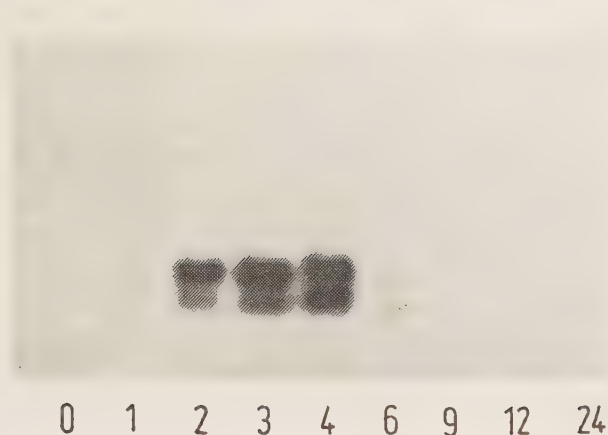


Abbildung 10. Expression von T_{ind} nach UV-Bestrahlung. Die Zahlen unter den Spuren geben die Zeit (in Stunden) nach der Bestrahlung an.

2.4. Strategie zur genauen Kartierung der SSV1-Transkripte

Die 5'-Enden aller durch Northern-Analyse identifizierten SSV1-RNAs wurden durch S1-Kartierung und Primer-Extensions-Analyse bestimmt. In einigen Fällen wurden zusätzlich die Gesamtlängen (T₁, T₂, T_{ind}) und die 3'-Enden der Transkripte (T₁, T₂, T₃) ermittelt. Sowohl für die S1-Kartierung als auch für die Primer-Extensions-Analyse wurden kurze (17mer) Oligonukleotide eingesetzt; sie dienten im Falle der S1-Kartierung zur Synthese von spezifischen einzelsträngigen DNA-Proben und im Falle der Primer-Extensions-Analyse als spezifische Primer der reversen Transkription. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide sowie die zur Gewinnung der DNA-Proben verwendeten Restriktionsenzyme und M13-Klone sind in Tabelle 2 aufgelistet. Abbildung 11 zeigt die Position der Oligonukleotide auf der Karte von SSV1. Soweit nicht

Tabelle 2: Zur Kartierung von SSV1-Transkripten eingesetzte Oligonukleotide und DNA-Proben

Probe	Oligonukleotid	Markierung der Probe	Schnittstelle am 3'-Ende der Probe	Länge der Probe (Nukleotide)	Matrize für die Synthese der Probe
P1a	N1; d(ACTCCTATTTCGAAGTA)	uniform	EcoRI	1338	M23
P1b	N1; d(ACTCCTATTTCGAAGTA)	uniform	AluI	420	M23
P1c	N1; d(ACTCCTATTTCGAAGTA)	uniform	Sau3AI	412	M23
P1d	N1; d(ACTCCTATTTCGAAGTA)	5'	AluI	420	M23
-	N2; d(AGGCGACTGTTCTTCT)	-	-	-	-
P3a	N3; d(GCCTTATCGAGATAACT)	uniform	EcoRI	898	M23
P3b	N3; d(GCCTTATCGAGATAACT)	uniform	HindII	547	M23
P4	N4; d(TGGGGTGAAGTACCGCT)	5'	EcoRI	380	M23
-	N5; d(CAGTCATCTGTTCTTCG)	-	-	-	-
P6	N6; d(TGTAACTCCCGACCA)	5'	AvaI	386	M6
P7	N7; d(AAATCCCCAACCCAGAG)	uniform	HaeIII	278	M6
P8	N8; d(GTGAACCGCCAGAAATC)	5'	HindII	501	M24
P9a	N9; d(CCATACGGTTTCTCTCC)	5'	Sall	745	M25
P9b	M13-Sequenzierungs-Primer	uniform	Sall	759	M26
P10	N10; d(TCTTTTACAACCTCTCGT)	uniform	Sall	114	M26
P11	N11; d(CGGGACTGAAATCTCAA)	5'	Sall	293	M27

anders angegeben, wurde für die Kartierungen RNA verwendet, die aus Zellen acht Stunden nach UV-Induktion gewonnen worden war. Wegen der geringeren Präzision der S1-Kartierung wurde die genaue Lage der 5'-Enden der Transkripte aus der Primer-Extensions-Analyse entnommen. Die S1-Kartierung stellte dennoch eine wesentliche Ergänzung der cDNA-Daten dar, da nur bei der S1-Kartierung überzeugende Kontrollversuche möglich sind, die die Identifizierung eventuell auftretender Artefakte erlauben.

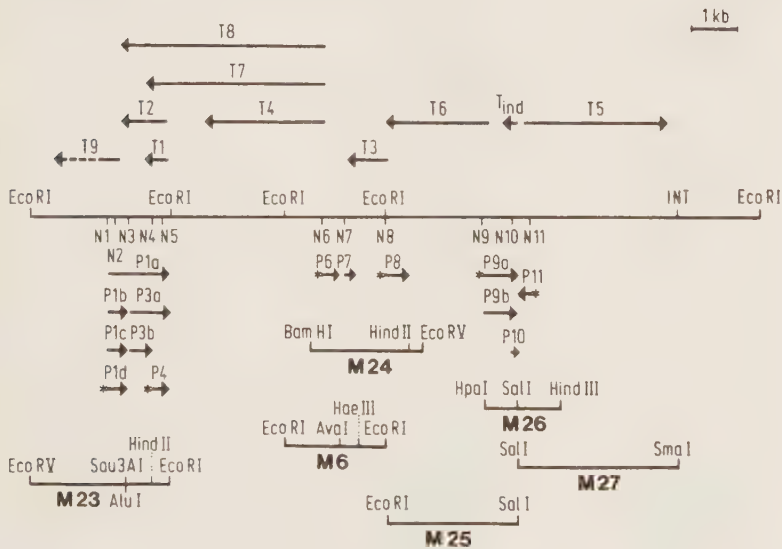
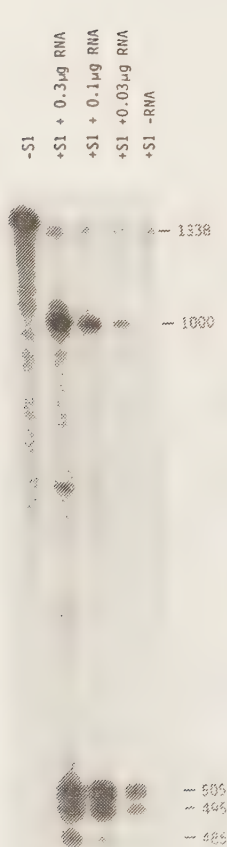
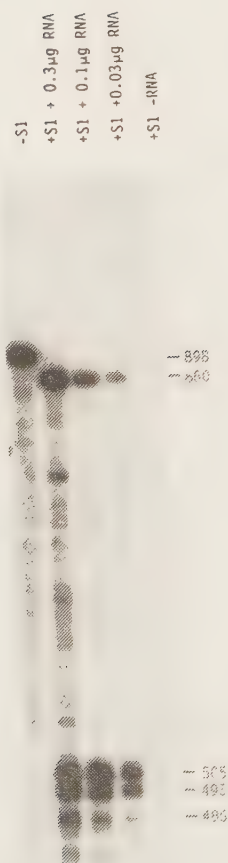


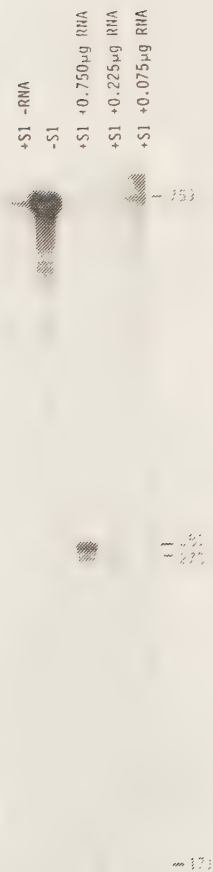
Abbildung 11. Strategie für die Primer-Extensions-Analyse und für die S1-Kartierung der SSV1-Transkripte. Sämtliche für Kartierungen verwendeten Oligonukleotid-Primer (N1 bis N11), S1-Proben (P1a bis P11) und zur Synthese von S1-Proben eingesetzten M13-Klone (M23 bis M27 sowie M6) sind unterhalb der linearisierten EcoRI-Karte von SSV1 eingezeichnet. Im Falle der M13-Klone sind neben den flankierenden Restriktionsschnittstellen nur diejenigen Schnittstellen angegeben, die dem 3'-Ende einer S1-Probe entsprechen. Uniform markierte DNA-Proben sind als einfache Pfeile dargestellt; ein Stern am Anfang eines Pfeiles kennzeichnet eine 5'-Markierung. "INT" bezeichnet die Lage der *attP*-Sequenz auf dem SSV1-Genom.



A



B



C

Abbildung 12. Gesamtlängenbestimmung von T1, T2 und T_{ind} über S1-Analyse.

Uniform markierte DNA-Proben wurden mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Die RNA in (A) und (B) stammte aus Zellen acht Stunden nach UV-Bestrahlung und in (C) aus Zellen drei Stunden nach UV-Bestrahlung. Die Zahlen neben den Spuren geben die über Größenmarker bestimmten Fragmentlängen (in Nukleotiden) an. Als Größenmarker dienten Restriktionsfragmente in (A) und (B) und eine Sequenzreaktion in (C).

A. Gesamtlängenbestimmung von T1 und T2. Eingesetzte Menge an Probe P1a: 100000 cpm. Auftrennung auf einem 4%igen Sequenzgel.

B. Gesamtlängenbestimmung von T1. Eingesetzte Menge an Probe P3a: 100000 cpm. Auftrennung auf einem 4%igen Sequenzgel.

C. Gesamtlängenbestimmung von T_{ind}. Eingesetzte Menge an Probe P9b: 80000 cpm. Auftrennung auf einem 6%igen Sequenzgel.

2.5. Gesamtlängenbestimmungen über S1-Analyse

2.5.1. Längenbestimmung von T1 und T2

Für die genaue Längenbestimmung von T1 wurde die uniform markierte Probe P3a verwendet, deren 5'-Ende innerhalb des von Transkript T2 abgedeckten Bereichs lag (Abb. 11). Nach S1-Nukleaseabbau wurden Fragmente von 860, 505, 495 und 485 Nukleotiden Länge erhalten (Abb. 12B). Das 860-Nukleotid-Fragment kommt dabei offenbar durch Hybridisierung mit T2 zustande und erlaubt Rückschlüsse auf das 5'-Ende dieser RNA, die durch eine gezielte Kartierung dieses 5'-Endes bestätigt wurden (siehe Abschnitt 2.6.1.). Die Fragmente von 505, 495 und 485 Nukleotiden entsprachen der erwarteten Länge von T1, wobei die Längenheterogenität durch multiple 3'-Enden bedingt war, wie eine gezielte Kartierung des 3'-Endes von T1 zeigte (siehe Abschnitt 2.9.1.).

Für die genaue Längenbestimmung von T2 wurde die uniform markierte Probe P1a verwendet, deren 5'-Ende unterhalb der Terminationsregion von T2 lag. Nach S1-Nukleaseabbau wurden Fragmente von etwa 1000, 505, 495 und 485 Nukleotiden Länge

erhalten (Abb. 12A). Das 1000 Nukleotid-Fragment entsprach dabei offenbar der Gesamtlänge von T₂, während die drei übrigen Fragmente identisch mit denen waren, die bei der Hybridisierung mit Probe P3a erhalten worden waren (Abb. 12B) und die die Länge von T₁ wiedergeben. Die Ergebnisse der Gesamtlängenbestimmung von T₁ und T₂ über S₁-Analyse deckten sich mit den entsprechenden Ergebnissen der Northern-Analyse und sie deckten sich außerdem mit den Daten, die separat für das 5'-Ende und die 3'-Enden von T₁ und T₂ gewonnen wurden. Aufgrund dieser Resultate kann ausgeschlossen werden, daß im Bereich von T₁ und T₂ Introns liegen, wie es anhand früherer Ergebnisse für T₂ diskutiert worden war (Zillig *et al.*, 1986).

2.5.2. Längenbestimmung von T_{ind}

Die genaue Länge von T_{ind} wurde über S₁-Nukleaseabbau bestimmt, um bei Kenntnis des 5'-Endes von T_{ind} dessen 3'-Ende festlegen zu können. Eine direkte Kartierung des 3'-Endes war durch die geringe Länge des Transkripts und das Fehlen geeigneter Restriktionsschnittstellen erschwert. Nach Hybridisierung von Gesamt-RNA (gewonnen 3 Stunden nach UV-Bestrahlung) mit der Probe P9b und S₁-Abbau der gebildeten Hybride wurden zwei Hauptfragmente von ca. 275 und 281 Nukleotiden Länge erhalten (Abb. 12C). Diese Länge entsprach in etwa derjenigen (0,3 kb), die bereits durch Northern-Analyse für T_{ind} erhalten worden war. Zusätzlich wurde eine kurze Leiter von Fragmenten im Bereich um 171 Nukleotide gefunden (Abb. 12C). Diese Fragmente entsprachen offenbar der bei der Northern-Analyse beobachteten kurzen T_{ind}-Spezies (Abb. 8).

2.6. Kartierung von 5'-Enden

2.6.1. Kartierung des 5'-Endes von T1 und T2

Aufgrund von Northern-Daten war vermutet worden, daß T1 und T2 ein gemeinsames 5'-Ende besitzen. Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu überprüfen und dieses 5'-Ende zu kartieren, wurde die Probe P4 gewählt, deren 5'-Ende mit Sicherheit innerhalb des Bereichs beider Transkripte liegt (Abb. 11). Nach Hybridisierung dieser Probe mit *Sulfolobus* B12 RNA und S1-Abbau wurde neben dem vollständig geschützten Ausgangsfragment nur ein einziges weiteres Fragment beobachtet, das etwa 338-339 Nukleotide lang war (Abb. 13). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß T1 und T2 tatsächlich ein gemeinsames 5'-Ende besitzen. Das Auftreten des vollständig geschützten DNA-Fragmentes kann durch die Hybridisierung mit den Transkripten T7 und T8 erklärt werden. Bei Einsatz großer RNA-Mengen ($>15 \mu\text{g}$) wurde die vollständig geschützte DNA-Probe zum Hauptfragment nach S1-Abbau (Abb. 13), obwohl T1 und T2 in vielfachem Überschuß gegenüber T7 und T8 vorlagen. Dies deutet darauf hin, daß für quantitative Aussagen mit einem Überschuß an DNA-Probe gearbeitet werden muß, da bei der Konkurrenz von zwei verschiedenen RNAs um die gleiche DNA-Probe die längere RNA das stabilere Hybrid bildet.

Die Primer-Extensions-Analyse des 5'-Endes von T1 und T2 ausgehend von Oligonukleotid N5 ergab, daß beide Transkripte auf dem G-Rest innerhalb einer Sequenz TTGA starten (Abb. 13), was im Wesentlichen dem Ergebnis der S1-Kartierung entsprach.

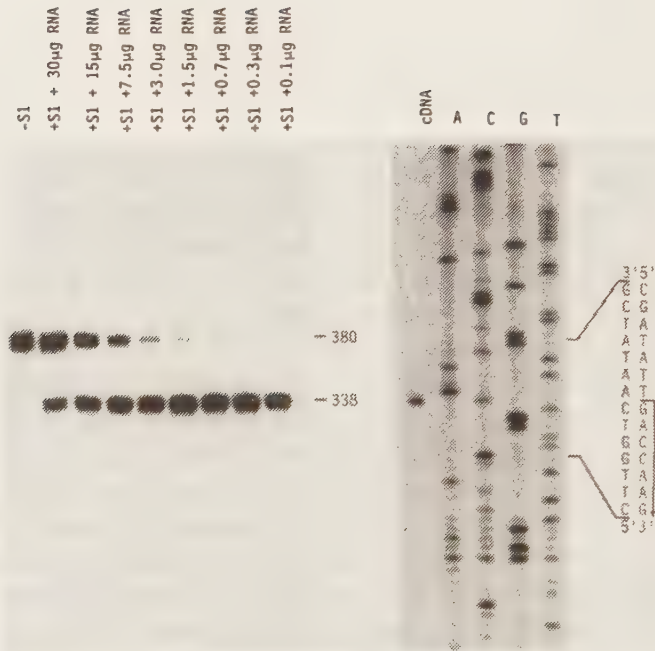
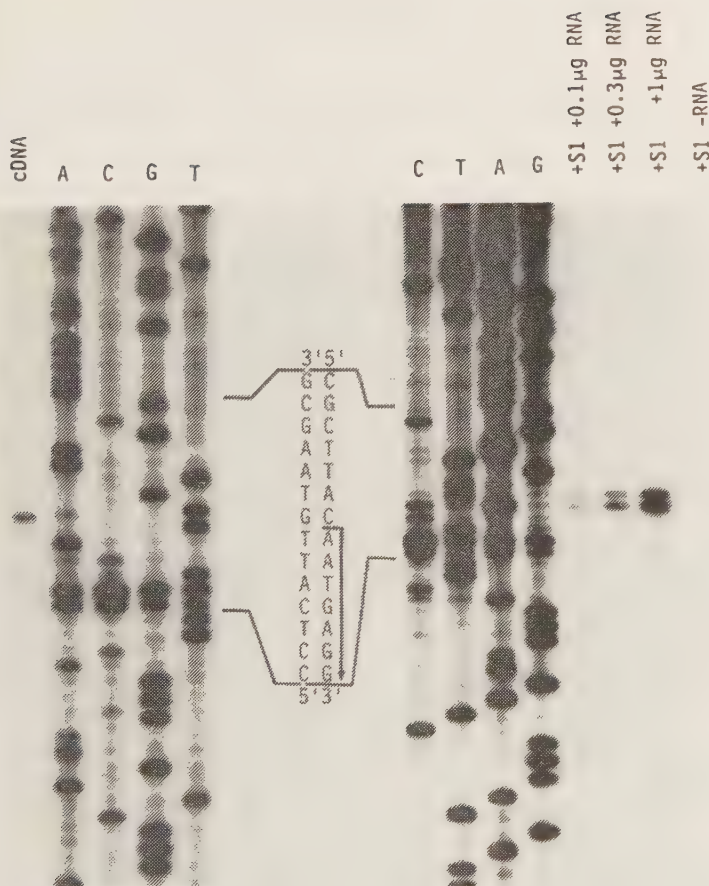


Abbildung 13. S1-Nuklease- und Primer-Extensions-Kartierung des 5'-Endes von T1 und T2.

Links: S1-Kartierung. 7000 cpm Probe P4 wurden mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Die Zahlen am rechten Rand geben die Fragmentlängen (in Nukleotiden) an.

Rechts: Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N5. In der Spur "cDNA" wurde 1/400 des Gesamtansatzes auf das Gel aufgetragen. Spuren A,C,G,T: Sequenzreaktion unter Verwendung von N5 als Primer.



Transcript T3

Abbildung 14. S1-Nuklease- und Primer-Extensions-Kartierung des 5'-Endes von Transkript T3.

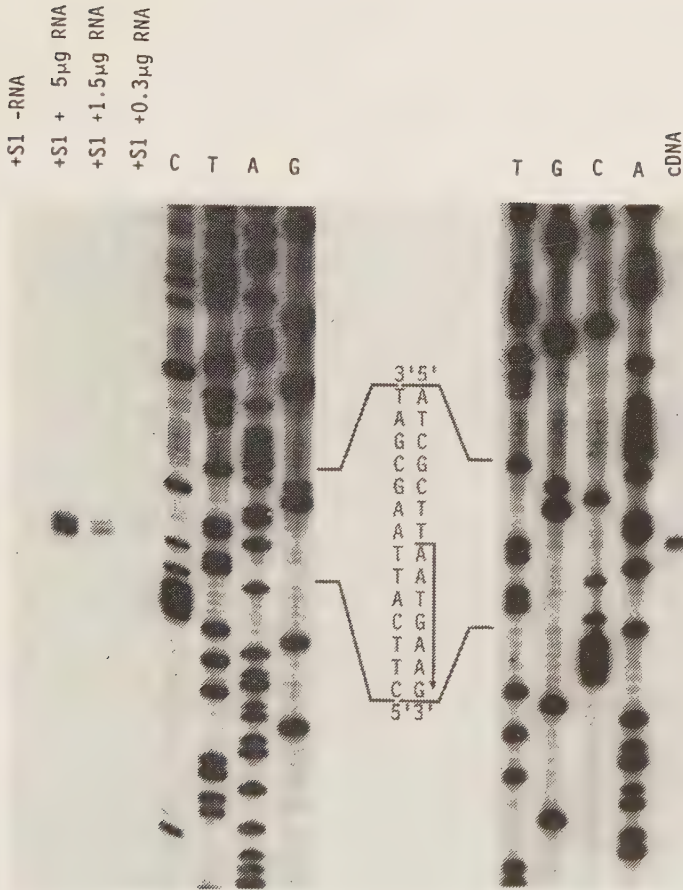
Im Falle der S1-Kartierung wurden 12000 cpm Probe P8 mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Bei der Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N8 wurde 1/80 des Gesamtansatzes in der Spur "cDNA" aufgetragen. Spuren A,C,G,T: Sequenzreaktion unter Verwendung von N8 als Primer.

2.6.2. Kartierung des 5'-Endes von T3

Für T3 war aus Northern-Daten bekannt, daß es stark mit dem viertgrößten EcoRI-Fragment der SSV1-DNA, aber nur schwach mit dem größten EcoRI-Fragment hybridisierte (Abb. 8). Unter Berücksichtigung der Transkriptionsrichtung war deshalb zu erwarten, daß das 5'-Ende von T3 in der Nähe der EcoRI-Restriktionsschnittstelle lag. Dementsprechend wurde zur Synthese einer DNA-Probe ein Oligonukleotid (N8) gewählt, das die entsprechende EcoRI-Schnittstelle überdeckte (Abb. 11). Nach Hybridisierung von *Sulfolobus* B12 RNA mit Probe P8 und anschließendem S1-Abbau wurden Fragmente von 93 und 94 Nukleotiden Länge erhalten (Abb. 14), was darauf hindeutete, daß das 5'-Ende von T3 etwa 76-77 Nukleotide von der EcoRI-Schnittstelle entfernt war. Die Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N8 ergab eine cDNA von 95 Nukleotiden Länge (Abb. 14), was dem ersten Nukleotid innerhalb einer Sequenz AATGA entsprach und sich im Wesentlichen mit dem Ergebnis der S1-Kartierung deckte. Das Trinukleotid ATG innerhalb dieser Sequenz ist das Initiationskodon eines 291 Aminosäure langen offenen Leserahmens, der etwa 25 Nukleotide vor dem 3'-Ende von T3 endet.

2.6.3. Kartierung des 5'-Endes von T4

Nach Vorliegen der S1-Kartierung für T1+T2 und T3 zeichnete sich eine mögliche Promoter-Konsensussequenz für SSV1 ab (siehe Abschnitt 2.8.), mit deren Hilfe in dem durch Northern-Analyse eingegrenzten Bereich ein möglicher Promoter für T4 gefunden wurde. Dementsprechend wurde zu Kartierungszwecken ein Oligonukleotid (N6) ausgewählt, das eine optimale Auflösung bei der S1-Analyse und der Primer-Extensions-Analyse erwarten ließ. Bei der S1-Kartierung des 5'-Endes von T4 mittels Probe P6 wurden Fragmente von 111 und 112 Nukleotiden Länge erhalten (Abb. 15), was einem



Transcript T4

Abbildung 15. S1-Nuklease- und Primer-Extensions-Kartierung des 5'-Endes von Transkript T4.

Im Falle der S1-Kartierung wurden 19000 cpm Probe P6 mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Bei der Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N6 wurde der Gesamtansatz in der Spur "cDNA" aufgetragen. Spuren C,T,A,G: Sequenzreaktion unter Verwendung von N6 als Primer.

5'-Ende an der durch Sequenzvergleich vorausgesagten Stelle entsprach. Die Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N6 ergab eine cDNA von 113 Nukleotiden Länge (Abb. 15), was sich im Wesentlichen mit dem Ergebnis der S1-Kartierung deckte. Wie im Falle von Transkript T3, kartierte auch das 5'-Ende von T4 auf dem ersten Nukleotid einer Sequenz AATGA. Eine weitere Ähnlichkeit mit Transkript T3 besteht darin, daß ein offener Leserahmen ein Nukleotid unterhalb des 5'-Endes von T4 beginnt. Dieser Leserahmen ist 792 Aminosäuren lang und endet etwa 0,28 kb vor dem durch Northern-Analyse bestimmten 3'-Ende von T4.

2.6.4. Kartierung der 5'-Enden von T5 und T6

Der Vergleich der aufgrund der Northern-Daten eingegrenzten Lage der 5'-Enden von T5 und T6 mit der Promoter-Konsensussequenz von T1+T2, T3 und T4 ergab keine ausreichend gute Übereinstimmung, um die Transkriptionsstarts der beiden RNAs über Sequenzvergleich vorauszusagen. Deshalb wurden zur S1-Kartierung von T5 und T6 zunächst Proben gewählt, deren 5'-Enden mit Sicherheit innerhalb der durch Northern-Analyse eingegrenzten Bereiche lagen, wenngleich zu erwarten war, daß die Fragmentgröße nach S1-Abbau keine gute Auflösung zulassen würde. Nach Hybridisierung von *Sulfolobus* B12 RNA mit diesen Proben und S1-Abbau wurden Fragmente von etwa 520 Nukleotiden Länge (T5) bzw. 265 Nukleotiden Länge (T6) erhalten (Daten nicht gezeigt). Zur genaueren Kartierung insbesondere von T5 wurden beide Kartierungen mit näher an den 5'-Enden der RNAs liegenden Proben wiederholt (Proben P11 und P9a, siehe Abb. 11). Im Falle von T5 wurden dabei Fragmente von 130 und 131 Nukleotiden Länge und im Falle von T6 Fragmente von 106 und 107 Nukleotiden Länge erhalten (Abb. 16). Die Primer-Extensions-Analyse ausgehend von den Oligonukleotiden N11 und N9 ergab cDNAs von 130 Nukleotiden Länge (T5) bzw. 106 Nukleotiden Länge (T6) (Abb. 16).

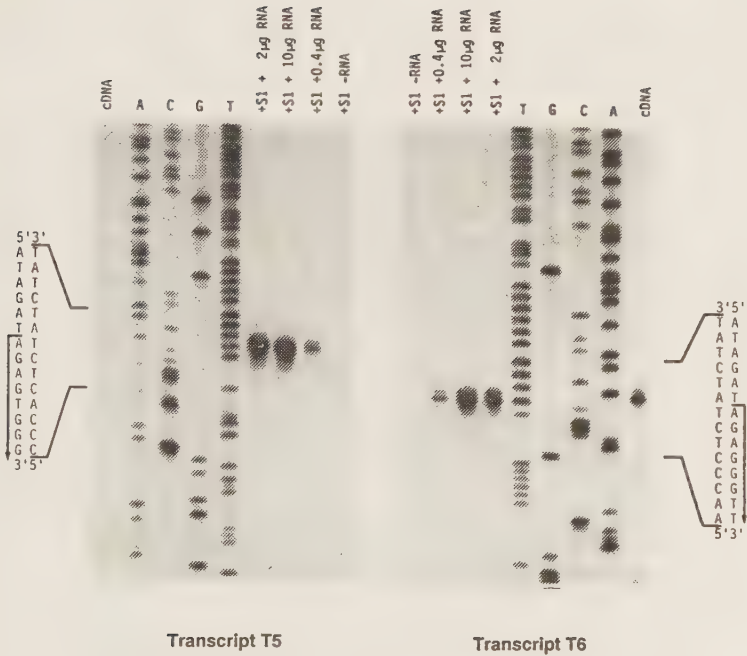


Abbildung 16. S1-Nuklease- und Primer-Extensions-Kartierung der 5'-Enden der Transkripte T5 und T6. Im Falle der S1-Kartierung wurden 10000 cpm Probe P11 (Transkript T5) bzw. 10000 cpm Probe P9a (Transkript T6) mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Bei der Primer-Extensions-Analyse von T5 ausgehend von Oligonukleotid N11 wurde der gesamte Ansatz und bei der Primer-Extensions-Analyse von T6 ausgehend von Oligonukleotid N9 wurde 1/8 des Ansatzes in der Spur "cDNA" aufgetragen. Spuren A,C,G,T: Sequenzreaktionen unter Verwendung der Oligonukleotide N11 (Transkript T5) bzw. N9 (Transkript T6) als Primer.

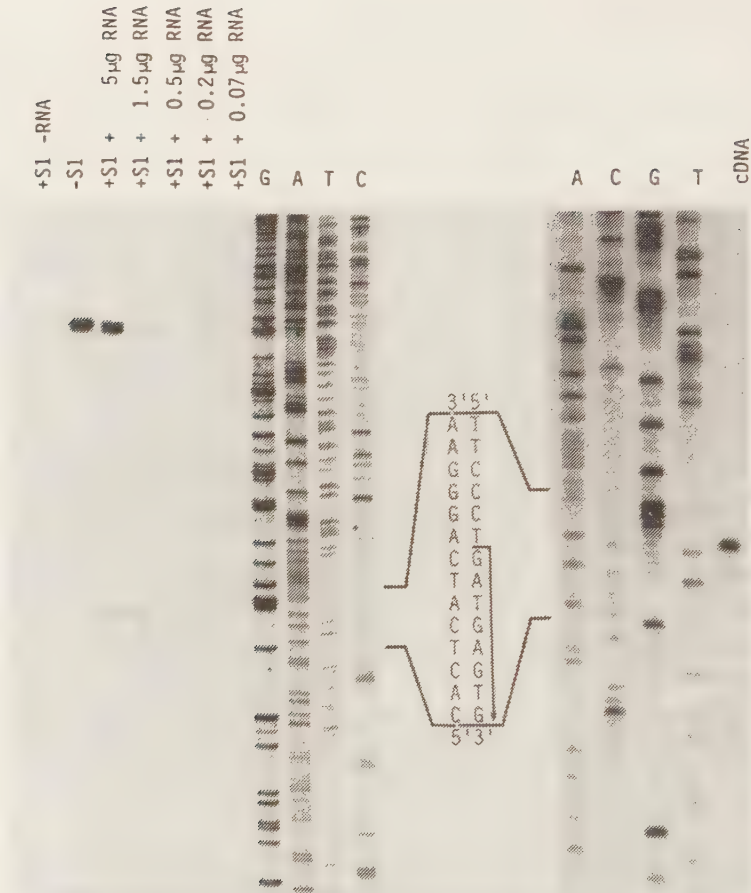
2.6.5. Kartierung des 5'-Endes von T9

Bei der S1-Kartierung des 3'-Endes von T2 (siehe Abschnitt 2.9.1.) war aufgefallen, daß neben den für dieses 3'-Ende erwarteten Fragmenten ein weiteres Fragment auftrat, das dem 5'-Ende einer bisher nicht charakterisierten RNA zu entsprechen schien. Diese Daten ließen vermuten, daß dieses 5'-Ende im Terminationsbereich von T2 kartiert und das zugehörige Transkript mindestens 300 Nukleotide lang ist. Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu überprüfen, wurde eine S1-Kartierung unter Verwendung der 5'-markierten Probe Pld vorgenommen. Dabei trat ein Fragment der erwarteten Länge (303-304 Nukleotide) auf (Abb. 18); die zugehörige RNA wurde T9 genannt. T9 war bei der Northern-Analyse nicht als diskrete Bande aufgefallen, was durch unscharfe Termination bedingt sein mag. Bei der S1-Kartierung des 5'-Endes von T9 fiel auf, daß die Probe Pld in erheblichem Umfang vollständig geschützt wurde (Abb. 18), was auf ein merkliches "Durchlesen" des T2-Terminators hindeutet. Die Primer-Extensions-Analyse von T9 ausgehend von Oligonukleotid N2 ergab eine cDNA von 116 Nukleotiden Länge (Abb. 18); die daraus ableitbare Lage des 5'-Endes von T9 deckte sich mit dem Ergebnis der S1-Kartierung.

Ebenso wie bei den Transkripten T3 und T4 beginnt ein offener Leserahmen ein Nukleotid unterhalb des 5'-Endes von T9. Dieser Leserahmen umfaßt 82 Aminosäuren; ihm schließen sich in gleicher Richtung fünf weitere offene Leserahmen mit Längen zwischen 92 und 277 Aminosäuren in unmittelbarer Aufeinanderfolge an.

2.6.6. Kartierung des 5'-Endes von T_{ind}

Die Lage von T_{ind} war bereits aufgrund der Northern-Analyse auf einen Bereich von etwa 150 Nukleotiden eingegrenzt worden (siehe Abschnitt 2.3.). Nach Hybridisierung



Transcript T9

Abbildung 18. S1-Nuklease- und Primer-Extensions-Kartierung des 5'-Endes von Transkript T9.

Im Falle der S1-Kartierung wurden 32000 cpm Probe P1d mit den angegebenen Mengen RNA hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Bei der Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N2 wurde der gesamte Ansatz in der Spur "cDNA" aufgetragen. Spuren G,A,T,C: Sequenzreaktionen unter Verwendung der Oligonukleotide N1 (links) bzw. N2 (rechts) als Primer.

von *Sulfolobus* B12 RNA (gewonnen aus Zellen 3 Stunden nach UV-Bestrahlung) mit der Probe P10 und anschließendem S1-Abbau wurden Fragmente von 79-82 Nukleotiden Länge erhalten (Abb. 19). Die Primer-Extensions-Analyse ausgehend von Oligonukleotid N10 ergab eine cDNA von 81 Nukleotiden Länge (Abb. 19) und war somit in Einklang mit dem Ergebnis der S1-Kartierung.

2.7. *In vitro*-capping von SSV1-RNAs

Um zu zeigen, daß die kartierten Enden von SSV1-RNAs auf Transkriptionsinitiation und nicht auf Prozessierung zurückgehen, wurde Gesamt-RNA aus *Sulfolobus* B12 (gewonnen 8 Stunden nach UV-Induktion) mit Vaccinia-Virus-Guanylyltransferase und [α -³²P]GTP inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollten nur solche RNAs markiert werden, die eine Oligophosphatgruppe am 5'-Ende tragen. Die Identifizierung einzelner SSV1-Transkripte erfolgte durch Hybridisierung dieser markierten RNA mit spezifischen, aber unmarkierten DNA-Proben und anschließendem S1-Abbau. Um möglichen Problemen mit der Empfindlichkeit dieser Methode zu entgehen, wurde diese Analyse auf die in größter Menge vorliegenden RNAs, d.h. auf T1+T2 und T3 beschränkt. Für die Identifizierung von T1+T2 wurde die Probe P4 und für die Identifizierung von T3 die Probe P8 verwendet (Abb. 11). Bei Hybridisierung mit Probe P4 wurde ein Fragment von etwa 335-337 Nukleotiden Länge erhalten und bei Hybridisierung mit Probe P8 eines von etwa 98-99 Nukleotiden Länge (Abb. 20). Die Längenmessung war dabei wie üblich über die Sequenzreaktionen der verwendeten DNA-Proben erfolgt. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß die zu messende Spezies eine RNA ist, die am 5'-Ende eine Cap-Gruppe trägt und zudem in ihrer Sequenz dem Gegenstrang der DNA-Probe entspricht. Dementsprechend muß bei der Längenmessung mit einem Fehler von einigen Nukleotiden gerechnet werden. Die erwartete Fragmentlänge ist im Falle von T1+T2 337 Nukleotide und im

Fälle von T3 95 Nukleotide. Aus der guten Übereinstimmung zwischen den erwarteten und den beobachteten Fragmentlängen kann geschlossen werden, daß T1+T2 und T3 tatsächlich Primärtranskripte darstellen. Wegen der hohen Sequenzkonservierung in der Umgebung der 5'-Enden von T1+T2, T3, T4, T9 und (wenngleich in eingeschränkter Form) T5 und T6 (siehe unten) gilt dies vermutlich auch für die anderen konstitutiven SSV1-Transkripte.

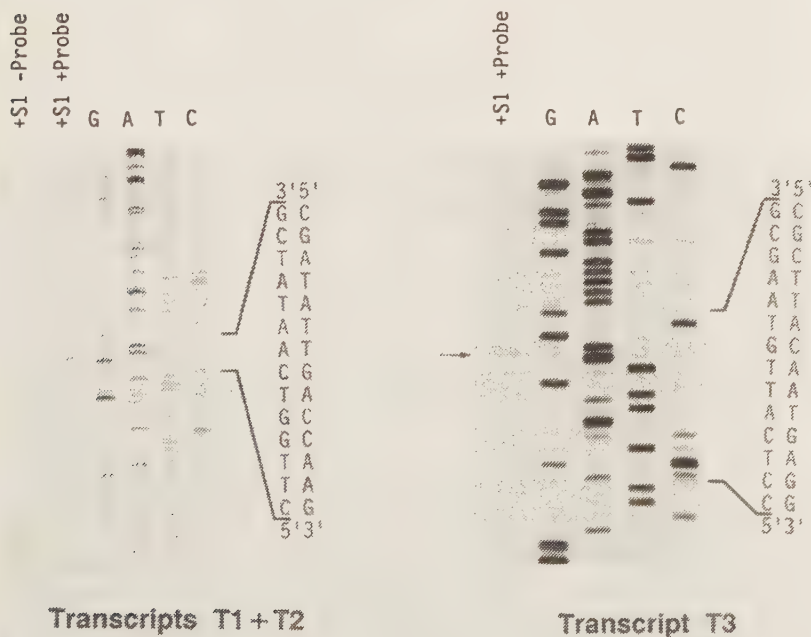


Abbildung 20. *In vitro*-capping von SSV1-RNAs. Gesamt-RNA aus UV-induziertem *Sulfolobus* B12 wurde mit [α - 32 P]GTP und Vaccinia-Virus-Guanylyltransferase inkubiert, mit unmarkierten, für SSV1-Transkripte spezifischen DNA-Proben hybridisiert und die resultierenden Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Als DNA-Proben wurden P4 (Transkripte T1+T2) bzw. P8 (Transkript T3) verwendet. Spuren G,A,T,C: Sequenzreaktionen unter Verwendung der Oligonukleotide N4 (Transkripte T1+T2) bzw. N8 (Transkript T3) als Primer.

2.8. DNA-Sequenzvergleich in der Umgebung der Transkriptionsstarts

Beim Vergleich der DNA-Sequenzen in unmittelbarer Nähe der Transkriptionsstarts von T1+T2, T3, T4 und T9 zeigte sich, daß dieser Start entweder auf dem G-Rest innerhalb des Trinukleotids TGA erfolgt (Transkripte T1+T2 und T9) oder auf dem ersten Nukleotid der Sequenz AATGA, die ebenfalls dieses Trinukleotid enthält (Transkripte T3 und T4) (Abb. 21). Im Falle von T5 und T6 liegt der Transkriptionsstart auf dem ersten A-Rest der Sequenz TAGA und im Falle von T_{ind} auf dem ersten Nukleotid der Sequenz ATGG (Abb. 21). In einem Abstand von 21-26 Nukleotiden vor dem Transkriptionsstart wurde im Falle von T1+T2, T3, T4 und T6 die Hexanukleotidsequenz TTTAAA gefunden. Im Falle von T5 und T9 treten im entsprechenden Abstand vom Transkriptionsstart Sequenzen auf, die um ein Nukleotid von der TTTAAA-Sequenz abweichen, während im Falle von T_{ind} keine derartige Sequenz gefunden wird (Abb. 21). Es gibt somit zwei allgemeine Sequenzkonservierungen im Bereich der 5'-Enden der konstitutiven SSV1-Transkripte: das Trinukleotid TGA (oder AGA bei T5 und T6) in der Nähe des Transkriptionsstarts und ein 21-26 Nukleotide oberhalb gelegenes Hexanukleotid mit der Konsensussequenz TTTAAA. Sehr ähnliche Sequenzen waren bereits als vermutliche Promoterelemente für das 16S/23S rRNA-Operon, das 5S rRNA-Gen und das 5S rDNA-assoziierte Transkript von *Sulfolobus* B12 gefunden worden (siehe Abschnitte 1.4, 1.6. und 1.7.). Entsprechend der dort eingeführten Nomenklatur wird das Trinukleotid TGA im Folgenden als "Box B" und das Hexanukleotid TTTAAA als "Box A" bezeichnet.

Neben diesen allgemeinen Sequenzhomologien der SSV1-Promotoren gibt es zusätzliche Homologien zwischen einigen dieser Transkriptionsstarts. Am auffälligsten sind diese zusätzlichen Homologien im Falle der Transkripte T5 und T6. Die Regionen zwischen den Positionen -58 und +6 (T5)

bzw -56 und +6 (T6) weisen eine Ähnlichkeit von 89% miteinander auf (Abb. 21). Zudem zeigt dieser konservierte Bereich eine interessante Struktur in seiner Nukleotidsequenz: ein Block von 22 Nukleotiden von Position -17 bis Position +5 wird 19 Nukleotide (T5) bzw. 17 Nukleotide (T6) weiter oberhalb nahezu exakt wiederholt. Zudem besteht dieser Sequenzblock seinerseits wieder aus einer direkt wiederholten Nukleotidsequenz von 11 Basen (Abb. 21). Eine auffällige Ähnlichkeit besteht weiterhin zwischen den



Abbildung 21. Vergleich der DNA-Sequenzen in der Umgebung der Transkriptstarts auf dem SSV1-Genom.

Im Falle der Transkripte T3, T4 und T9 bzw. T5 und T6 sind die DNA-Sequenzen unter Zulassung kleiner Lücken so übereinandergeschrieben, daß die besonders hohe Sequenzhomologie erkennbar wird. Die elf Nukleotide lange, jeweils viermal wiederholte DNA-Sequenz im Promoterbereich von T5 und T6 ist durch waagerechte Pfeile gekennzeichnet. Im dritten Repeat von T5 und im vierten Repeat von T6 liegt eine Abweichung von einem Nukleotid von der ansonsten vollständig konservierten Sequenz vor. Die Transkriptstarts sind durch senkrechte Pfeile markiert. Zu offenen Leserahmen gehörende translationelle Startkodons sind durch Balken unterhalb der DNA-Sequenzen gekennzeichnet und ausgefüllte Kreise oberhalb der DNA-Sequenzen geben mögliche Ribosomenbindungsstellen an. Vermutliche Promotorelemente sind unterstrichen.

Sequenzen am 5'-Ende von T5 und T_{ind}: Das Heptanukleotid TGGGATG findet sich bei T5 vier Nukleotide und bei T_{ind} ein Nukleotid vom 5'-Ende entfernt (Abb. 21). Eine weitere über die allgemeine Konsensussequenz hinausgehende Ähnlichkeit im Promoterbereich besteht für die Transkripte T3, T4 und T9. Vergleicht man die DNA-Sequenzen zwischen den Positionen -40 und +6 (Transkripte T3 und T9) bzw. -39 und +6 (Transkript T4), so findet man eine Homologie von 60% zwischen T4 und T9, 62% zwischen T3 und T4 und 66% zwischen T3 und T9 (Abb. 21).

Eine auffällige Gemeinsamkeit der Transkripte T3, T4 und T9 ist der Beginn offener Leserahmen bei Position +2 (Abb. 21). In allen drei Fällen finden sich im Bereich der ersten zwei bis drei Kodons Nukleotidsequenzen, die zum 3'-Ende der *Sulfolobus* 16S rRNA komplementär sind und somit Ribosomenbindungsstellen darstellen könnten. Eine ähnliche Situation tritt bei dem UV-induzierbaren Transkript T_{ind} auf, bei dem ein offener Leserahmen bei Position +1 beginnt (Abb. 21).

2.9. Kartierung von 3'-Enden

2.9.1. Kartierung der 3'-Enden von T1 und T2

Das 3'-Ende von T1 wurde durch Hybridisierung von *Sulfolobus* B12 RNA mit der uniform markierten Probe P3b und anschließendem S1-Abbau bestimmt. Neben der vollständig geschützten Probe, die offenbar auf Hybridisierung mit T2 zurückging, wurden dabei drei ineinander übergehende Leitern von Fragmenten beobachtet, die auf ein heterogenes 3'-Ende von T1 hindeuteten (Abb. 22A). Die Länge der Hauptfragmente lag bei 169-170, 181-184 und 189-193 Nukleotiden, was Gesamtlängen von T1-Subspezies von etwa 478, 491 und 499 Nukleotiden entspricht. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Gesamtlängenbestimmung von T1 (485, 495 und 505

Nukleotide), wodurch gesichert ist, daß die beobachteten Fragmente tatsächlich dem 3'-Ende von T1 entsprechen.

Zur Kartierung des 3'-Endes von T2 wurde *Sulfolobus* B12 RNA mit den uniform markierten Proben Plb und Plc hybridisiert und die resultierenden Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Diese beiden Proben unterschieden sich nur in der Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, wobei Plb um acht Nukleotide länger war als Plc (Tabelle 2). Da zum Zwecke der 3'-Kartierung die Fragmentlänge von diesen Restriktionsschnittstellen aus gemessen wird, sollten alle dem 3'-Ende von T2 entsprechenden Fragmente bei Verwendung von Probe Plb um acht Nukleotide länger sein als bei Verwendung von Probe Plc. Nach S1-Abbau der Hybride von SSV1-RNA mit Probe Plb wurde eine Leiter von Fragmenten im Bereich von 136 bis etwa 116 Nukleotiden beobachtet (Abb. 22B). Wie erwartet, war diese gesamte Leiter von Fragmenten bei Verwendung von Probe Plc um etwa acht Nukleotide nach geringeren Längen hin verschoben (Daten nicht gezeigt). Bei den S1-Kartierungen mittels der Proben Plb und Plc trat jedoch auch ein Fragment auf, welches unabhängig von der verwendeten Probe eine Länge von etwa 305 Nukleotiden aufwies (Abb. 22B). Dieses Fragment mußte somit einer RNA entsprechen, die entweder vollständig oder aber nur mit ihrem 5'-Ende innerhalb des von beiden Proben abgedeckten Bereichs kartiert. Wie bereits im Abschnitt 2.6.5. gezeigt, geht das 305-Nukleotid-Fragment auf das 5'-Ende von T9 zurück. In Übereinstimmung mit den Daten über die 5'-Kartierung von T9 wurde bei Verwendung der Proben Plb und Plc ein Teil des Ausgangsfragments in seiner gesamten Länge geschützt (Abb. 22B), was dem "Durchlesen" des T2-Terminators entspricht.

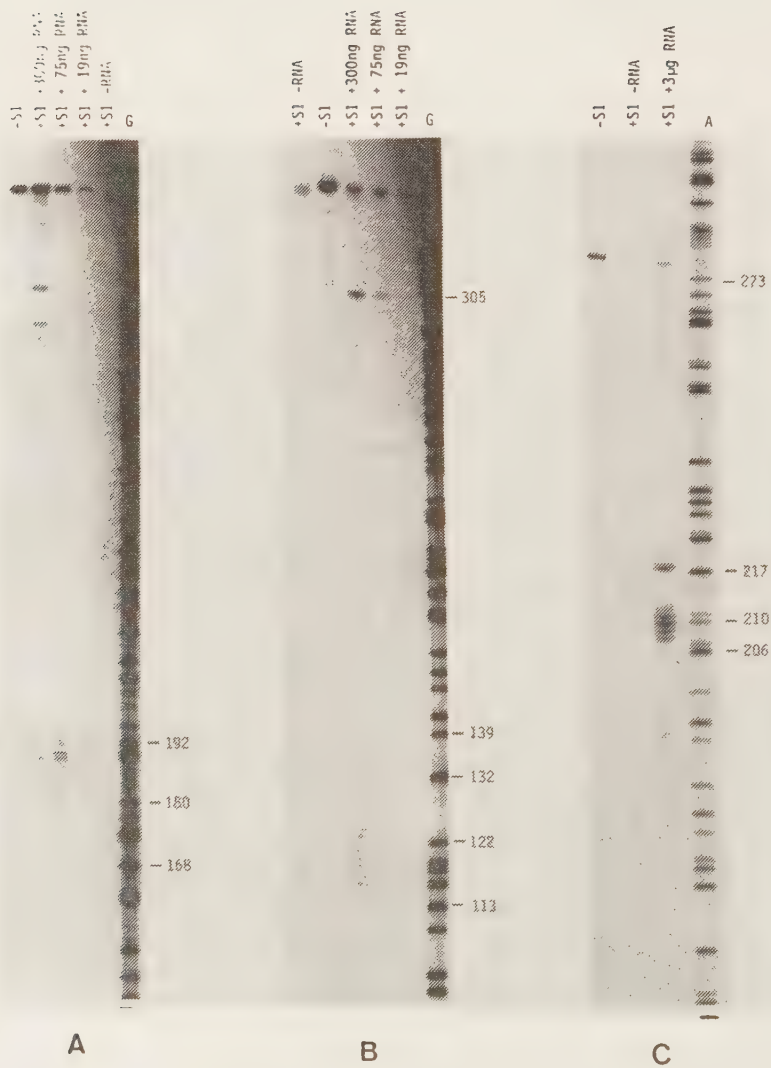


Abbildung 22. Kartierung der 3'-Enden von T1, T2 und T3. Die oberhalb der Spuren angegebenen Mengen an *Sulfolobus* B12 RNA wurden mit uniform markierten einzelsträngigen DNA-Proben hybridisiert und diese Ansätze mit S1-Endonuklease abgebaut. Die Spuren "-S1" zeigen die zur Hybridisierung eingesetzten Ausgangsfragmente. Die Zahlen rechts neben den Sequenzreaktionen (Spuren G,A) geben Fragmentlängen in Nukleotiden an. Bei (A) und (B) wurde jeweils die Gesamtmenge der S1-Ansätze, bei (C) 1/5 des Ansatzes aufgetragen.

A. S1-Kartierung des 3'-Endes von T1 mittels Probe P3b (26000 cpm).

B. S1-Kartierung des 3'-Endes von T2 mittels Probe P1b (26000 cpm).

C. S1-Kartierung des 3'-Endes von T3 mittels Probe P7 (90000 cpm).

2.9.2. Kartierung des 3'-Endes von T3

Zur Kartierung des 3'-Endes von T3 wurde *Sulfolobus* B12 RNA mit der uniform markierten Probe P7 hybridisiert und dieser Ansatz anschließend mit S1-Nuklease verdaut. Es traten dabei ein Fragment von 218 Nukleotiden Länge und eine kurze Leiter von Fragmenten im Größenbereich von 208-212 Nukleotiden auf (Abb. 22C). Unter Berücksichtigung der Lage des 5'-Endes von T3 ergibt sich daraus für dieses Transkript eine Gesamtlänge von 907 Nukleotiden (entsprechend dem längsten Fragment der 3'-Kartierung), was mit der durch Northern-Analyse ermittelten Gesamtlänge von 0,9 kb übereinstimmt.

2.10. DNA-Sequenzvergleich im Bereich der 3'-Enden der SSV1-Transkripte

Aufgrund von S1-Kartierungsdaten wurden Informationen über die Lage von fünf 3'-Enden erhalten, und zwar für T1, T2, T3 und die beiden T_{ind}-Spezies. Im letzteren Falle ergab sich die Lage der 3'-Enden aus der Kartierung des gemeinsamen 5'-Endes und den über S1-Abbau bestimmten

Gesamtlängen der RNAs. Obgleich bei der S1-Analyse von *in vivo*-RNA generell nicht ausgeschlossen werden kann, daß die kartierten 3'-Enden auf Prozessierung längerer Vorläufermoleküle beruhen, wird im Folgenden vereinfachend der Begriff "Termination" gebraucht, um das Zustandekommen dieser 3'-Enden zu beschreiben. In allen analysierten Fällen kartierten die 3'-Enden der SSV1-Transkripte unmittelbar hinter einer Heptanukleotidsequenz TTTTTYT (Y=C,T), die ihrerseits im Anfangsbereich von 16-19 Nukleotide langen, an Pyrimidinnukleotiden reichen Sequenzabschnitten lag (>80% C+T; siehe Abb. 23). Die offensichtliche Bedeutung der TTTTTYT-Sequenz für die Transkriptionstermination ergibt sich daraus, daß sie auf dem gesamten SSV1-Genom nur neunmal vorkommt, wobei fünf dieser Sequenzen den identifizierten 3'-Enden von SSV1-Transkripten entsprechen und die vier zusätzlichen Sequenzen in nicht-transkribierten Bereichen liegen. Die Suche nach möglichen Sekundärstrukturen im Terminationsbereich der SSV1-Transkripte ergab keinen

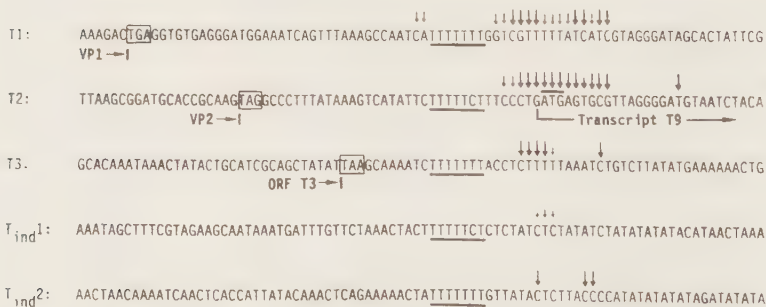


Abbildung 23. Vergleich der DNA-Sequenzen im Bereich der 3'-Enden von SSV1-Transkripten.

Die Positionen von S1-kartierten 3'-Enden sind durch Pfeile oberhalb der DNA-Sequenz gekennzeichnet. Die als vermutliches Terminationssignal fungierende Sequenz TTTTTYT ist unterstrichen. T_{ind}¹ und T_{ind}² bezeichnen die beiden Terminationsbereiche des UV-induzierbaren Transkripts T_{ind}. Stopkodons für Proteingene (VP1, VP2) bzw. für einen langen offenen Leserahmen (ORF T3) sind umrandet.

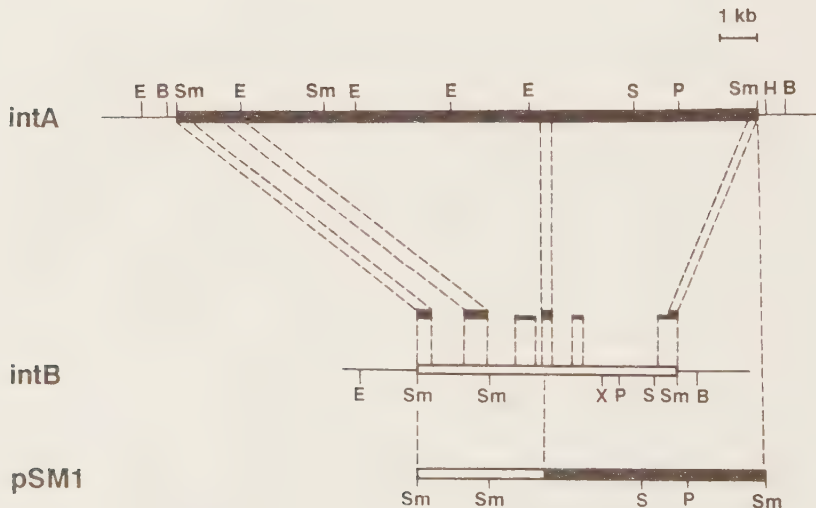
generellen Zusammenhang zwischen der Möglichkeit zur Ausbildung solcher Strukturen und den beobachteten Terminationspunkten.

3. Integrierte Formen der SSV1-DNA

3.1. Integrationsstelle des gesamten SSV1-Genoms (*intA*)

Eine vollständige Kopie der SSV1-DNA ist ortsspezifisch in das Chromosom von *Sulfolobus* B12 integriert (Yeats et al., 1982). Die beiden Übergangsstellen zwischen SSV1-DNA und chromosomaler DNA lagen als in pBR325 klonierte EcoRI-Fragmente vor, wobei die Klonierung von Siobhan Yeats aus diesem Labor durchgeführt worden war. Der Klon mit der "linken" Seite der Integrationsstelle enthielt 1,8 kb SSV1-Sequenz und 0,9 kb chromosomale Sequenz und der Klon mit der "rechten" Seite der Integrationsstelle enthielt 6,2 kb SSV1-Sequenz und 5,2 kb chromosomale Sequenz. Die Definition von "links" und "rechts" entspricht der in den Abbildungen 8, 11 und 24 gezeigten Orientierung der SSV1-DNA. Zur Sequenzierung der linken Übergangsstelle wurde ein 2,0 kb BglII/EcoRI-Fragment in M13 kloniert und die DNA-Sequenz ausgehend von der im chromosomalen Bereich liegenden BglII-Schnittstelle gelesen (Abb. 24). Zur Sequenzierung der rechten Übergangsstelle wurde ein 3,7 kb SalI/HpaI-Fragment in M13 kloniert und die DNA-Sequenz ausgehend von der im chromosomalen Bereich liegenden HpaI-Schnittstelle bestimmt (Abb. 24). Es zeigte sich, daß die integrierte Form von einer 44 bp-Sequenz (*att*) mit jeweils gleicher Orientierung flankiert wird. Der die "rechte" Kopie dieser Sequenz enthaltende Bereich wird im Folgenden als *attR(A)* und der die "linke" Kopie enthaltende Bereich als *attL(A)* bezeichnet. Die *att*-Sequenz kommt auf der zirkulären SSV1-DNA in einer Kopie vor (*attP*). Etwa in

der Mitte dieser Sequenz liegt eine Schnittstelle für *SmaI*, ein Restriktionsenzym, das nur zwei Erkennungsstellen auf der SSV1-DNA hat und auch die chromosomale DNA des Wirtes nur selten schneidet.



Abbildungung 24. Vergleich von *intA*, *intB* und *pSM1*.

Die zirkuläre *pSM1*-DNA wurde in dieser Darstellung an der innerhalb der *att*-Sequenz liegenden *SmaI*-Schnittstelle linearisiert. Einander entsprechende Abschnitte von *pSM1* und *intB* bzw. von *pSM1* und SSV1 (identisch mit *intA*) sind exakt übereinander gezeichnet. Die im Falle von *intB* sequenzierten Teilbereiche sind als Balken oberhalb der Karte von *intB* angegeben. Schmale Balken repräsentieren dabei Sequenzen, für die keine eindeutige Zuordnung zu Bereichen der SSV1-DNA möglich war. Breite Balken repräsentieren Sequenzen, die eine deutliche Homologie zu SSV1-DNA aufweisen; die entsprechende Zuordnung zu *intA* ist durch Strichelung angedeutet. Bei der Restriktionskarte von *intA* ist von mehreren *HpaI*-Schnittstellen nur diejenige gezeigt, von der aus die Sequenz von *attR(A)* ermittelt wurde.

Abkürzungen für Restriktionsenzyme: B: BglII, E: EcoRI, H: HpaI, P: PstI, S: SalI, Sm: SmaI, X: XbaI.

3.2. Nachweis weiterer Integrationsstellen und Charakterisierung von *intB*

Bei Southern-Hybridisierungen von *Sulfolobus* B12 DNA mit markierter SSV1-DNA konnten alle stark hybridisierenden Fragmente auf die zirkuläre SSV1-DNA bzw. auf die oben beschriebene integrierte Form *intA* zurückgeführt werden. Eine Reihe schwächer hybridisierender Banden konnte damit jedoch nicht erklärt werden. Die Anzahl dieser zusätzlichen Banden betrug 4 für BglII, 6 für PstI und 5 für XbaI. Diese unterschiedliche Anzahl von Banden je nach dem verwendeten Restriktionsenzym deutete darauf hin, daß zumindest einige der hybridisierenden Bereiche auf dem Genom benachbart sind. Durch Verwendung von immer kleineren Subfragmenten der SSV1-DNA als radioaktiver Probe zeigte sich, daß alle diese Banden mit einem 1,1 kb großen Fragment hybridisierten, das die *att*-Sequenz etwa 300 Nukleotide von einem Ende entfernt enthielt (Abb. 25).

Zur genaueren Charakterisierung solcher SSV1-homologen Sequenzen wurde derjenige chromosomale Bereich ausgewählt, der (abgesehen von *intA*) am stärksten mit SSV1-DNA hybridisierte. Eine Southern-Analyse ergab, daß dieser Bereich (*intB*) auf einem 9 kb BglII/EcoRI-Fragment lag. Dieses Fragment wurde in pBR322 (geschnitten mit EcoRI und BamHI) kloniert und von dem resultierenden Plasmid eine Restriktionskarte angefertigt (Abb. 24). Als Grundlage zur weiteren Charakterisierung dieses Bereichs durch Sequenzanalyse wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß innerhalb des klonierten Abschnittes eine SSV1-Integration über die 44 bp *att*-Sequenz zu finden ist und daß die dieser Sequenz benachbarten Bereiche eine besonders hohe Sequenzhomologie zur SSV1-DNA zeigen. Die Restriktionskartierung von *intB* ergab, daß im klonierten Bereich drei Schnittstellen für SmaI lagen (Abb. 24), was einen Hinweis auf mögliche *att*-Sequenzen gab. Zunächst wurde die DNA-Sequenz im Bereich der beiden äußeren SmaI-Schnittstellen

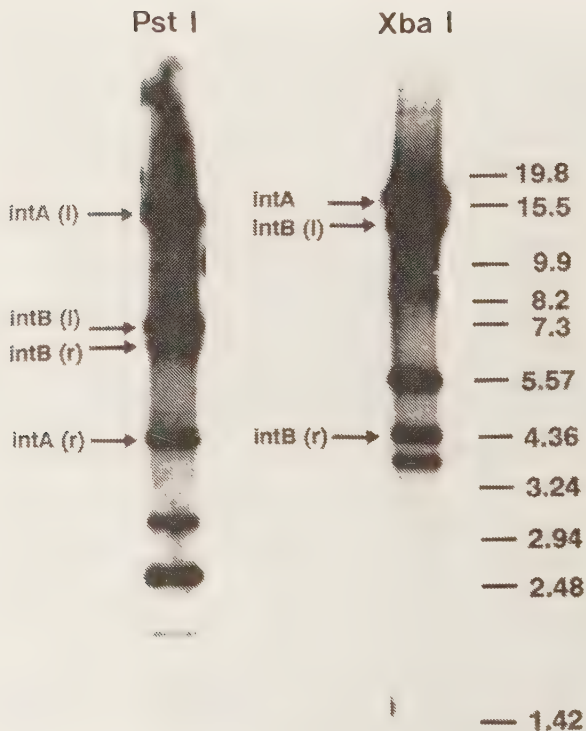


Abbildung 25. Southern-Analyse SSV1-homologer Sequenzen im Genom von *Sulfolobus* B12.

Die für diese Analyse verwendete DNA stammte aus einer *Sulfolobus*-B12-Variante, die die freie Plasmidform der SSV1-DNA verloren hatte, im Übrigen jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp keine erkennbaren Veränderungen im Restriktionsmuster SSV1-homologer Sequenzen aufwies. Als Probe diente ein 1,1 kb großes Fragment der SSV1-DNA, das die *att*-Sequenz ca. 300 Nukleotide von einem Ende entfernt enthielt. Im Falle der beiden gezeigten Restriktionsverdauungen konnten die zu *intA* bzw. *intB* gehörenden Fragmente sicher identifiziert werden (Pfeile). Dabei ist zu beachten, daß PstI einmal innerhalb von *intA* und einmal innerhalb von *intB* schneidet, während XbaI zwar eine Schnittstelle innerhalb von *intB*, jedoch keine Schnittstelle innerhalb von *intA* besitzt (siehe auch Abb. 24). Mit Ausnahme des XbaI-Fragmentes von *intA* gibt es somit jeweils ein dem "rechten" Teil und ein dem "linken" Teil der integrierten Sequenz entsprechendes hybridisierendes Fragment (als "r" und "l" gekennzeichnet). Die Zahlen am rechten Rand geben die Fragmentlängen eines DNA-Größenmarkers in Kilobasen an.

bestimmt und mit der Sequenz der SSV1-DNA verglichen. Es zeigte sich, daß beide SmaI-Schnittstellen geringfügig veränderten *att*-Sequenzen entsprachen, wobei die eine dieser Sequenzen (*attL(B)*) zwei Basenaustausche und die andere (*attR(B)*) drei Basenaustausche gegenüber der entsprechenden Sequenz aus SSV1 aufwies (Abb. 26). Die beiden Basenaustausche von *attL(B)* fanden sich an den gleichen Stellen wie bei *attR(B)*, so daß sich diese beiden Sequenzen voneinander durch einen einzigen Nukleotidaustausch unterschieden (Abb. 26). An die beiden flankierenden *att*-Sequenzen von *intB* schlossen sich nach innen die gleichen SSV1-Sequenzen an, wie sie für eine ortsspezifische Integration analog zu *intA* zu erwarten waren. Im Falle der linken Seite waren die an die *att*-Sequenz angrenzenden 337 Nukleotide völlig identisch mit SSV1-DNA, während im Falle der rechten Seite bereits nach zehn Nukleotiden die ersten Basenaustausche im Vergleich mit SSV1-DNA auftraten (Abb. 26) und nach etwa 0,35 kb keine Homologie zu SSV1 mehr erkennbar war. Auch im Falle der linken Seite traten mit zunehmendem Abstand von der *att*-Sequenz deutliche Abweichungen von der SSV1-Sequenz auf, jedoch war im gesamten, an *attL(B)* angrenzenden sequenzierten Bereich (0,44 kb) eine klare Homologie zur SSV1-DNA erkennbar. Einige interne Bereiche der 7 kb langen *intB*-DNA wurden sequenziert, um das Ausmaß der Homologie mit SSV1 abzuschätzen. Diese Analyse führte zu dem Ergebnis, daß Bereiche hoher Homologie mit solchen Bereichen abwechselten, bei denen keine Ähnlichkeit mit SSV1 mehr erkennbar war (Abb. 24).

3.3. Vergleich der chromosomalen Randsequenzen von *intA* und *intB*

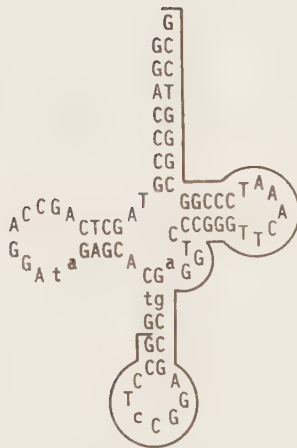
Der Vergleich der flankierenden chromosomalen Sequenzen von *intA* und *intB* zeigte auf der linken Seite nur geringe Ähnlichkeiten, während sich auf der rechten Seite stark konservierte Bereiche von 31 Nukleotiden Länge an die

att-Sequenz anschlossen (Abb. 26). Bei Einbeziehung der *att*-Sequenz selbst ergaben sich zusammenhängende Bereiche von 75 Nukleotiden Länge, die 91% Homologie zwischen *attR(A)* und *attR(B)* aufwiesen (Abb. 26). Eine genaue Analyse dieser homologen Bereiche zeigte, daß sie als typische tRNA-Strukturen gezeichnet werden können, wobei zusätzlich zur Sekundärstruktur auch auffallende Ähnlichkeiten mit der Primärstruktur von tRNAs vorlagen (Abb. 26 und Abb. 27).

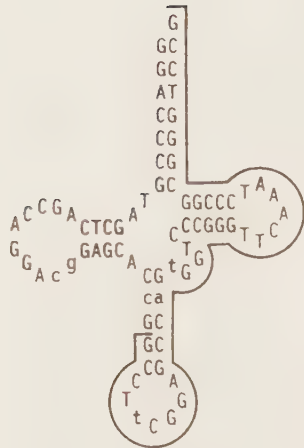
3.4. Rekombination zwischen *intB* und SSV1-DNA

Bei der Restriktionsanalyse von Gesamt-cccDNA aus UV-induziertem *Sulfolobus* B12 zeigte sich, daß neben der zirkulären SSV1-DNA noch mindestens eine weitere Spezies von cccDNA in merklicher Menge vorlag. Am deutlichsten war dies bei der Spaltung mit den Enzymen *Sal*I und *Pst*I zu erkennen, die die SSV1-DNA linearisieren. Bei der Spaltung mit diesen Enzymen fiel neben der linearen SSV1-DNA eine weitere lineare DNA von 9,1 kb auf, die ca. 1-2% der Gesamt-cccDNA ausmachte (Abb. 28). Dieses zweite Plasmid (pSM1) hybridisierte in der Southern-Analyse stark mit SSV1-DNA.

Zur genaueren Charakterisierung vom pSM1 wurde es über seine *Sal*I-Schnittstelle in pBR322 kloniert und von dem resultierenden rekombinanten Plasmid eine Restriktionskarte angefertigt. Der Vergleich dieser Restriktionskarte mit derjenigen von SSV1 zeigte, daß ein Bereich von etwa 5,8 kb in SSV1 und in pSM1 identisch ist (Abb. 24). Diese Identität konnte durch punktuelle DNA-Sequenzanalyse bestätigt werden. Bei der Restriktionsanalyse und partiellen DNA-Sequenzanalyse von pSM1 zeigte sich weiterhin, daß der nicht mit SSV1 identische Bereich (3,3 kb) aus der Integrationsstelle *intB* stammte (Abb. 24). Es handelte sich dabei um einen zusammenhängenden, bei *attL(B)* beginnenden Bereich (Abb. 24). Die einfachste Erklärung für die Bildung von pSM1 ist demnach die Rekombination zwischen *intB* und der



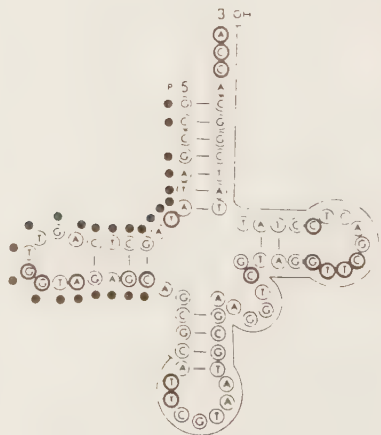
SSV1 attR(A)



SSV1 attR(B)

Abbildung 27. Kleeblattstrukturen für die als SSV1-Integrationsstellen dienenden tRNA-Gene.

Neben attR(A) und attR(B) (vgl. Abb. 26) ist als Vergleich auch die Integrationsstelle des *Salmonella*-Phagen P22 gezeigt (entnommen aus Pierson III & Kahn, 1987). Die att-Sequenz ist in allen Fällen durch eine die tRNA-Struktur umgebende Linie angegeben.



P22 attB

Sal I Pst I

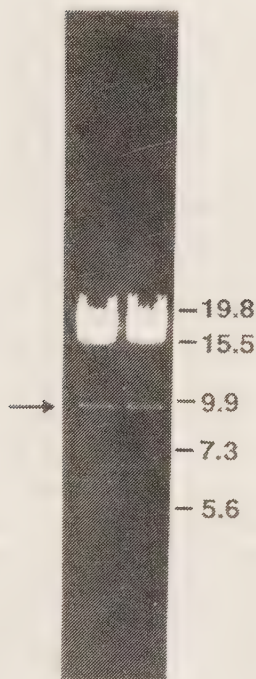


Abbildung 28. Restriktionsverdaus von Gesamt-cccDNA aus UV-induziertem *Sulfolobus* B12.

Je 1,5 µg DNA wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und die Produkte auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Hauptfragment entspricht linearisierter SSV1-DNA; die untere schwache Bande (Pfeil) ist linearisiertes pSM1. Die Zahlen am rechten Rand geben die Fragmentgrößen eines parallel aufgetragenen DNA-Größenmarkers in Kilobasen an.

zirkulären SSV1-DNA, wobei offenbar ein Austausch von 9,7 kb SSV1-DNA gegen 3,3 kb *intB*-DNA erfolgt war. Zur Festlegung der Rekombinationsstellen wurden die entsprechenden Bereiche von *intB* und pSM1 sequenziert und die erhaltenen Sequenzdaten miteinander verglichen. Es zeigte sich dabei, daß eine homologe Rekombination vorlag, da sich beide Rekombinationsstellen in Bereichen befanden, in denen die Sequenz zwischen SSV1 und *intB* vollständig konserviert war (Abb. 24). Die "linke" Rekombinationsstelle entsprach dem Bereich von 29 Nukleotiden innerhalb der *att*-Sequenz, der in *attP* und *attL(B)* identisch war. Im Falle der "rechten" Rekombinationsstelle war der Bereich der Sequenzidentität zwischen *intB* und SSV1 40 Nukleotide lang.

V. DISKUSSION

1. Organisation und Transkription der ribosomalen RNA-Gene

In *Sulfolobus* B12 sind das 16S rRNA-Gen und das 23S rRNA-Gen unmittelbar hintereinander angeordnet, während das Gen für die 5S rRNA isoliert liegt. Eine ähnliche Organisation der ribosomalen RNA-Gene wurde für die ebenfalls extrem thermophilen, schwefelabhängigen Archaeobakterien *Desulfurococcus mobilis* (Larsen et al., 1986; Leffers et al., 1987) und *Thermoproteus tenax* (Kjems et al., 1987) gefunden. In allen darauf hin untersuchten extrem halophilen und methanogenen Archaeobakterien hingegen sind die Gene für alle drei ribosomalen RNAs hintereinander in der Reihenfolge 5'-16S-23S-5S-3' angeordnet, wobei meist ein tRNA-Gen zwischen die 16S rDNA und die 23S rDNA eingeschoben ist (zur Übersicht siehe Böck et al., 1986). Die Organisation von ribosomalen RNA-Genen in der Reihenfolge 5'-16S-tRNA-23S-5S-3' ist typisch für Eubakterien, während die Abtrennung des 5S rRNA-Gens und das Fehlen eines tRNA-Gens zwischen den beiden großen rDNAs typisch für Eukaryoten ist (zur Übersicht siehe Gray & Doolittle, 1982). Die Organisation der ribosomalen RNA-Gene ist somit eine Eigenschaft, bei der die Archaeobakterien nicht als geschlossene Gruppe erscheinen, sondern ein Teil von ihnen eine eubakterielle und ein anderer Teil eine eukaryotische Merkmalsausprägung zeigt.

Die direkte Bildung der 5S rRNA von *Sulfolobus* B12 durch Transkription des Gens ohne nachträgliche Prozessierung am 5'-Ende ist der erste nachgewiesene Fall dieser Art in einem Prokaryoten, während die 5S rDNA der Eukaryoten in der gleichen Weise transkribiert wird (zur Übersicht siehe Shenk, 1981). Neben *Sulfolobus* B12 wurde bisher in einem weiteren Archaeobakterium die Transkription eines 5S rRNA-Gens untersucht, das nicht in 3'-Position zu den

beiden anderen rRNA-Genen liegt. Es handelt sich hierbei um *Methanococcus vannielii*, ein methanogenes Archaeobakterium, das vier rRNA-Operons des Typs 5'-16S-23S-5S-3' und ein zusätzliches 5S rRNA-Gen enthält. Dieses zusätzliche 5S rRNA-Gen liegt innerhalb einer großen tRNA-Transkriptionseinheit und die reife 5S rRNA wird offenbar durch Prozessierung eines polycistronischen Vorläufertranskripts gebildet (Wich et al., 1984, 1986).

2. Promotersequenzen für die rRNA-Gene von *Sulfolobus* B12

Der Vergleich der DNA-Sequenzen in der Umgebung der Transkriptionsstarts für das 5S rRNA-Gen und für das 16S/23S rRNA-Operon hatte ergeben, daß die 5'-Enden der RNAs in beiden Fällen auf dem mittleren Nukleotid einer Sequenz TGC ("Box B") kartieren und daß eine Oktanukleotidsequenz TTTATATG ("Box A") in einer Entfernung von 20 Nukleotiden (5S rRNA) bzw. 24 Nukleotiden (16S/23S rRNA) vor dem Transkriptionsstart zu finden war. Im Falle der 5S rRNA war durch *in vitro*-capping nachgewiesen, daß das kartierte 5'-Ende tatsächlich auf Transkriptionsinitiation beruhte und im Falle des 16S/23S rRNA-Operons wurden bei der S1-Kartierung keine Fragmente gefunden, die auf einen weiter oberhalb des Gens liegenden Transkriptionsstart hindeuten würden. Dies läßt darauf schließen, daß die oberhalb beider Gene konservierten Sequenzbereiche Promoterelemente darstellen. Da das 5S rRNA-Gen nicht zur gleichen Transkriptionseinheit gehört wie die beiden anderen rRNA-Gene, alle drei Genprodukte jedoch in einer 1:1:1-Stöchiometrie benötigt werden, muß die Initiationsfrequenz für die beiden Transkriptionsstarts in etwa gleich groß sein. Die Tatsache, daß der Abstand zwischen den Boxen A und B im Falle des 16S/23S rRNA-Operons um vier Nukleotide größer ist als im Falle des 5S rRNA-Gens, legt den Schluß nahe, daß der Abstand zwischen den beiden Promoterelementen innerhalb gewisser Grenzen keinen wesentlichen Einfluß auf die Promo-

terstärke ausübt. Neben den Boxen A und B wurde eine weitere Sequenz identifiziert, die zwischen dem Bereich oberhalb des 5S rRNA-Gens und dem Bereich oberhalb des 16S/23S rRNA-Transkriptionsstarts konserviert ist. Es handelt sich dabei um die Heptanukleotidsequenz CTTATAT, die im Falle des 16S/23S rRNA-Operons 52 Nukleotide und im Falle des 5S rRNA-Gens 51 Nukleotide vor der Box A liegt. Ähnliche Sequenzen in einem ähnlichen Abstand vom Box A-Element wurden weder für die SSV1-Promotoren aus *Sulfolobus* B12 gefunden noch wurden sie als Promoterelement in anderen Archaeobakterien beschrieben. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Sequenzelement, das eine spezielle Bedeutung für die Expression der rRNA-Gene in *Sulfolobus* hat.

3. Promotersequenzen für die SSV1-Transkripte

Der Vergleich der DNA-Sequenzen in der Umgebung der Transkriptionsstarts für die konstitutiven SSV1-RNAs hatte ergeben, daß in einem Abstand von 21 bis 26 Nukleotiden vor dem Transkriptionsstart eine hochkonservierte Hexanukleotidsequenz TTTAAA ("Box A") auftritt, wobei die Abweichung von dieser Konsensussequenz maximal ein Nukleotid beträgt. Im Falle der Transkripte T1+T2, T3, T4 und T9 findet sich eine Trinukleotidsequenz TGA ("Box B") in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts, wobei der Initiationspunkt im Falle von T1+T2 auf dem G-Rest dieser Trinukleotidsequenz und im Falle von T3 und T4 auf einem A-Rest zwei Nukleotide vor dieser Sequenz liegt. Im Falle von T9 folgen zwei "Box B"-Sequenzen unmittelbar aufeinander, wobei der Transkriptionsstart auf dem G-Rest der ersten derartigen Sequenz liegt. Je nachdem, welche dieser TGA-Sequenzen als Box B angesehen wird, liegt der Transkriptionsstart wie im Falle von T1+T2 auf dem G-Rest in der Mitte von Box B oder aber, wie im Falle von T3 und T4, zwei Nukleotide davor.

Der Vergleich der DNA-Sequenzen im Bereich des Transkriptionsstarts von T3, T4 und T9 zeigte, daß ein Bereich von Position -40 bis Position +6 zu mehr als 60% konserviert ist. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen diesen Transkripten ist der Beginn von offenen Leserahmen ein einziges Nukleotid unterhalb des 5'-Endes der jeweiligen RNA. Die zugehörigen hypothetischen Proteine weisen untereinander jedoch keine auffallenden Ähnlichkeiten auf, so daß es unwahrscheinlich ist, daß die hohe Sequenzkonservierung im Promoterbereich auf Genduplikation zurückgeht.

Im Falle der Transkripte T5 und T6 sind die Promoterstrukturen insofern ungewöhnlich, als die Initiation innerhalb einer elf Nukleotide langen Sequenz erfolgt, die im Promoterbereich in vier Kopien vorliegt. Zwar tritt in der Umgebung des Transkriptionsstarts keine perfekte Box B-Sequenz TGA, sondern nur die ähnliche Sequenz AGA auf, jedoch finden sich Box A-Sequenzen im erwarteten Abstand vom Transkriptionsstart.

Zusammenfassend kann für die Promoterregionen der konstitutiven SSV1-Transkripte gesagt werden, daß in allen Fällen zwei konservierte Bereiche gefunden werden, wobei der eine in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts liegt und der zweite etwa 23 Nukleotide davor zu finden ist. Über diese generellen Ähnlichkeiten hinaus gibt es jedoch auch weitergehende Sequenzkonservierungen, die nur einige der SSV1-Transkripte betreffen.

Im Falle des UV-induzierbaren Transkripts T_{ind} initiiert die Transkription auf dem ersten Nukleotid der Sequenz ATGG. Obwohl diese Situation anders ist als im Falle der konstitutiven SSV1-Transkripte, wurde eine identische Situation im Falle des Gens für die Untereinheit C der RNA-Polymerase aus *Sulfolobus acidocaldarius* gefunden (G. Pühler, unveröffentlichtes Ergebnis). Man kann deshalb vermuten, daß das Trinukleotid TGG als Box B-Element in

Sulfolobus fungieren kann und die Abweichung von der kanonischen Sequenz TGA nicht mit der UV-Induzierbarkeit von T_{ind} zusammenhängt. Ein Box A-Element wurde für T_{ind} jedoch nicht gefunden, eine Beobachtung, die mit der besonderen Regulation dieses Transkripts korreliert. Die Abwesenheit dieser Sequenz im Falle von T_{ind} legt die Vermutung nahe, daß die Expression dieses Transkripts über einen induzierbaren Transkriptionsfaktor positiv reguliert wird und nicht das Ergebnis einer Derepression ist. Im letzteren Falle würde man erwarten, daß im nicht-induzierten Zustand ein "Standardpromoter" durch ein Repressormolekül blockiert wird. Ein solcher "Standardpromoter" liegt bei T_{ind} jedoch nicht vor.

4. Konsensussequenz für archaebakterielle Promotoren

Bei der Diskussion einer Konsensussequenz für archaebakterielle Promotoren stellen sich die Fragen, ob die Promotoren für stabile RNA-Gene und für Proteingene in Archaebakterien identisch sind und ob alle Archaebakterien prinzipiell ähnliche Promotersequenzen besitzen. Der Vergleich der Expressionssignale für die rRNA-Gene aus *Sulfolobus* B12 mit denen für die SSV1-Transkripte deutet darauf hin, daß die erste Frage für *Sulfolobus* bejaht werden kann. Auffällig ist jedoch, daß bei den beiden rRNA-Promotoren eine Box B-Sequenz TGC auftritt, während im Falle der meisten SSV1-Promotoren ein Trinukleotid TGA als Box B-Sequenz fungiert (Abb. 29). Weiterhin wurde eine Sequenz CTTATAT etwa 52 Nukleotide oberhalb der Box A-Elemente beider rRNA-Promotoren gefunden, während diese Sequenz im Falle der SSV1-Transkripte abwesend war. Die Anzahl kartierter Transkriptionsstarts in *Sulfolobus* (insbesondere solcher für stabile RNA-Gene) erscheint jedoch nicht ausreichend, um die funktionelle Bedeutung dieser Sequenzunterschiede eindeutig abschätzen zu können.

Im Falle anderer Archaeobakterien wurde bisher keine sowohl für stabile RNA-Gene als auch für Proteingene gültige Promotersequenz innerhalb desselben Organismus beschrieben. Während Transkriptionsstarts für stabile RNA-Gene sowohl in *Halobacterium cutirubrum* (Dennis, 1985) als auch in *Methanococcus vanniellii* (Wich et al., 1986) und *Thermoproteus tenax* (Wich et al., 1987) kartiert wurden, sind zuverlässige Kartierungsdaten für mRNAs nur für *Halobacterium* verfügbar (DasSarma et al., 1984; Betlach et al., 1984; Blanck & Oesterhelt, 1987; Lechner & Sumper, 1987). Es ergibt sich hier jedoch das Problem, daß nahezu alle charakterisierten Gene aus *Halobacterium* einer im Detail kaum verstandenen Regulation unterliegen und deshalb mit besonderen Promoterstrukturen gerechnet werden muß. Zudem wurde nur in einem einzigen Fall nachgewiesen, daß das kartierte 5'-Ende auf Transkriptionsinitiation beruht (DasSarma et al., 1984). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse über die Initiationspunkte konstitutiv produzierter mRNAs legen jedoch den Schluß nahe, daß auch in *Halobacterium* keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Promotoren für stabile RNA-Gene und denen für Proteingene bestehen (F. Gropp, persönliche Mitteilung).

Aus den oben genannten Gründen muß sich eine Diskussion über eine generelle Konsensussequenz für archaeobakterielle Promotoren im Wesentlichen auf die Daten für stabile RNA-Gene stützen. Im Falle von *Methanococcus vanniellii* (Wich et al., 1986) und *Thermoproteus tenax* (Wich et al., 1987) wurden je drei Transkriptstarts für stabile RNA-Gene kartiert. Für *Halobacterium cutirubrum* liegen Kartierungsdaten für mehrere Transkriptstarts oberhalb des rRNA-Operons vor (Dennis, 1985). Die Sequenzen für die multiplen Promotoren dieses Operons sind einander jedoch extrem ähnlich und es ist deshalb anzunehmen, daß diese in Serie angeordneten Expressionssignale auf ein Multiplikationsereignis zurückgehen. Ein Vergleich der Promotersequenzen aus *Sulfolobus* mit den entsprechenden Sequenzen der

GEN UND ORGANISMUS	SEQUENZ	QUELLE
T.t. 16S/23S rRNA:	AGCGAAAAATTTTAATTTAGGGTGTITTAGGATGGTCGCCTTAATG	Wich et al., 1987
T.t. tRNA ^{Ala} :	TAGCGAAAAATTTAAATCGGTGAGTAAGTACGCTCGGGCCGGTAGTCT	Wich et al., 1987
T.t. tRNA ^{Met} :	GACAAAGCTTTTAAATTCGCGCAAAGCTTAGACCTAGCGGGGTAGGCC	Wich et al., 1987
H.c. rRNA P1:	TTCGACGGTGTITTTATGTACCCACCACCTCGGATGAGATGCGAACGACGT	Dennis, 1985
H.c. rRNA P2:	AGTCCGATGCCCTTAAGTACAACAGGGTACTTCGGTGGAAATGCGAACGAC	Dennis, 1985
H.c. rRNA P3:	GATTCGATGCCCTTAAGTAAACACGGGTGTTCGGATGAGATGCGAACGAC	Dennis, 1985
H.c. rRNA P4:	GATTCGATGCCCTTAAGTAAACACGGGCGTTACGAGGAATGCGAACGAC	Dennis, 1985
H.c. rRNA P5:	GATTCGATGCCCTTAAGTAAACACGGGCGTTCCGGGAAATGCGAACGTC	Dennis, 1985
H.h. Bakteriopsin:	TGGGTCGTAGATTACACACATATCTCGTTAGGTACTGTTGCATGTTGG	DasSarma et al., 1984
M.v. rRNA:	ATACCTAAACAAATACATATTACAACACGTTTTCATATTATGCAATCAA	Wich et al., 1986
M.v. tRNA ^{Arg} :	TAACCGAAATTTTATTACTAGAATACCCCTCTACTACTGCTCTTGA	Wich et al., 1986
M.v. tRNA + 5S rRNA:	CTACCGAAACCTTTATATTATAACACTAGTATTCAGTATGCGAACAAA	Wich et al., 1986
S.s. 16S/23S rRNA:	TAGAAGTTAGATTATATGGGATTTCGAACAATATGTATAATGCGGATG	Diese Arbeit
S.s. 5S rRNA:	GTAGTTAATTTTATATGTGTTATGAGTACTTAATTTGCCACCACGGC	Diese Arbeit
S.s. ORF(5S):	TGGGATGGGCTTTATATTTCTCTGATTTTAAGATTACTCTGAGTTGAAT	Diese Arbeit
S.s. SSV1, T1+T2:	AACTGGAGGGCTTTAAACGTAAGCGGGAAGCCGATATGACCAAGGAT	Diese Arbeit
S.s. SSV1, T3:	GTTAGGCTCTTTTAAAGTCTACCTCTTTTTCGCTTACATGAGGAAGT	Diese Arbeit
S.s. SSV1, T4:	AGATAGCCCTTTTAAAGCCATAAATTTTATCGCTTAATGAGGTGGG	Diese Arbeit
S.s. SSV1, T9:	AGTAGGCCCTTTATAAAGTCATATTCTTTTCTTCCCTGATGAGTGCCT	Diese Arbeit
S.s. SSV1, T5:	ATAGAGTAAGACTTAAATCTACTAATTTATACATAGAGTATAGATAGTGG	Diese Arbeit
S.s. SSV1, T6:	ATAGAGTAAGCTTAAATCTACTATATAGATAGAGTATAGATAGAGGTTTC	Diese Arbeit
Konsensus:	TTTA ^T A ^A T ^T GC ^A	

Abbildung 29. Vergleich archaebakterieller Promotersequenzen.

Neben den in dieser Arbeit charakterisierten Transkriptionsstarts (außer Tind) enthält diese Aufstellung die DNA-Sequenzen im Bereich sämtlicher, für Archaebakterien kartierten 5'-Enden von Transkripten. Ausgenommen davon sind diejenigen mRNAs, bei denen unklar ist, ob die kartierten 5'-Enden auf Transkriptionsinitiation zurückgehen (siehe Text). Die jeweiligen "Box A"-Elemente sind übereinandergeschrieben und umrandet. Die Transkriptionsstarts sind durch Pfeile gekennzeichnet und konservierte Sequenzen in ihrer unmittelbaren Umgebung ("Box B") sind unterstrichen. Abkürzungen für Organismen: T.t.: *Thermoproteus tenax*, H.c.: *Halobacterium cutirubrum*, H.h.: *Halobacterium halobium*, M.v.: *Methanococcus vanniellii*, S.s.: *Sulfolobus* sp. Stamm B12.

anderen Archaeobakterien ergab, daß die Promotersequenzen zwischen *Methanococcus* und *Sulfolobus* praktisch völlig konserviert sind (Abb. 29). Dies ist insofern von Bedeutung, als diese beiden archaeobakteriellen Gattungen phylogenetisch nur wenig miteinander verwandt sind (Woese & Olsen, 1986), was wiederum vermuten läßt, daß die Promotersequenzen innerhalb der Archaeobakterien generell stark konserviert sind. Dieser Schluß ist jedoch nur bedingt richtig, ein Umstand, der die Ableitung einer allgemeinen Promoter-Konsensussequenz offenbar erheblich verzögert hat. Im Falle des rRNA-Operons von *Halobacterium cutirubrum* wird zwar eine Box B-Sequenz TGC gefunden, jedoch liegen die kartierten Transkriptstarts generell in einer Position zwei Nukleotide unterhalb dieser Sequenz, während die Transkription im Falle von *Methanococcus* und *Sulfolobus* auf dem G-Rest von Box B initiiert (Abb. 29). Außerdem weicht die Box A-Sequenz in *Halobacterium* merklich von der zwischen *Sulfolobus* und *Methanococcus* hochkonservierten Sequenz TTTATA ab (Abb. 29). Im Falle von *Thermoproteus tenax* ist zwar die Box A-Sequenz recht ähnlich der in *Methanococcus* und *Sulfolobus*, jedoch ist die Sequenzkonservierung in der Umgebung des Transkriptionsstarts auf ein GC-Dinukleotid beschränkt, das zudem in einem relativ variablen Abstand zum Initiationspunkt auftritt (Abb. 29).

Thermoproteus gehört zum gleichen phylogenetischen Zweig der Archaeobakterien wie *Sulfolobus* während *Halobacterium* dem gleichen Zweig wie *Methanococcus* angehört (Pace et al., 1986; Woese & Olsen, 1986; Leffers et al., 1987). Der Vergleich der Promotersequenzen in diesen vier Gattungen führt somit zu dem überraschenden Ergebnis, daß die Sequenzkonservierung zwischen Vertretern des gleichen Zweiges niedriger ist als zwischen den nur entfernt verwandten Gattungen *Sulfolobus* und *Methanococcus*. Die Ableitung einer Konsensussequenz für archaeobakterielle Promotoren sollte sich somit primär an den offenbar stark konservierten Expressionssignalen von *Methanococcus* und *Sulfolobus* orientieren. Es

ergibt sich dabei eine Sequenz $TTTA_A^T--20-25b--A^T TGA_C^A$, wobei das zweite Sequenzelement in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts liegt.

Der Vergleich dieser Konsensussequenz mit Promotersequenzen in Eubakterien und Eukaryoten zeigt, daß keine auffälligen Ähnlichkeiten mit eubakteriellen Promotersequenzen bestehen. Zwar gibt es im Falle der eubakteriellen Promotoren ebenfalls zwei konservierte Sequenzbereiche, jedoch liegen diese Sequenzen bei den Positionen -10 und -35 (zur Übersicht siehe Doi & Wang, 1986). Eine Ausnahme von dieser Regel sind eubakterielle Promotoren für die Transkription von *nif*-Genen (Ausubel, 1984). In diesem Falle liegen die konservierten Sequenzelemente bei -12 und -23, was aber auch nicht der archaebakteriellen Situation entspricht, zumal die Region bei -23 keinerlei Sequenzähnlichkeit mit der archaebakteriellen Box A aufweist. Vergleicht man die archaebakterielle Promoter-Konsensussequenz mit eukaryotischen Promotoren, so findet man eine auffällige Ähnlichkeit mit den von RNA-Polymerase II erkannten Expressionssignalen. Der eukaryotische Pol II-Promoter besteht aus zwei generell konservierten Sequenzelementen: einem Dinukleotid CA in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts und einer AT-reichen "TATA-Box" etwa in Position -25 bis -30 (eine Zusammenstellung eukaryotischer Pol II-Promotoren findet sich in Bucher & Trifonov, 1986). Die relative Lage konservierter Sequenzen zum Transkriptionsstart ist somit für archaebakterielle Promotoren und eukaryotische Pol II-Promotoren identisch. Zudem besteht eine auffällige Sequenzähnlichkeit zwischen der archaebakteriellen Box A (Konsensus: $TTTA_A^T$) und der eukaryotischen TATA-Box (Konsensus: TATAAA).

Es ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, inwieweit diese Ähnlichkeit zwischen Expressionssignalen sich auch in der Struktur der jeweiligen transkribierenden Enzyme wiederfindet. Untersuchungen von Huet *et al.* (1983)

hatten ergeben, daß die RNA-Polymerasen von Archaeobakterien und Eukaryoten sowohl in ihrem Komponentenmuster als auch anhand immunologischer Kriterien auffallend ähnlich sind. Diese früheren Ergebnisse wurden jetzt anhand der Aminosäuresequenzen der großen Untereinheiten dieser Enzyme bestätigt (Pühler et al., 1988). Es zeigte sich dabei, daß die Homologie zwischen den eukaryotischen Enzymen und den archaeobakteriellen Enzymen erheblich größer ist als diejenige zwischen jeder dieser RNA-Polymerasen und der RNA-Polymerase aus *E. coli*. Von den drei eukaryotischen RNA-Polymerasen zeigt die RNA-Polymerase II das größte Maß an Homologie mit dem archaeobakteriellen Enzym (H. Leffers und G. Pühler, unveröffentlichte Ergebnisse), ein Resultat, das mit den Daten über archaeobakterielle Promotersequenzen im Einklang ist. Somit scheinen sowohl die Promoterstrukturen als auch die transkribierenden Enzyme spezifisch zwischen Eukaryoten und Archaeobakterien konserviert zu sein.

5. Terminatorsequenzen in Archaeobakterien

Der Vergleich der DNA-Sequenzen im Bereich der 3'-Enden von SSV1-Transkripten hatte ergeben, daß in allen Fällen eine Sequenz TTTTTYT der Position der kartierten 3'-Enden vorausgeht. Diese Sequenz lag jeweils innerhalb einer 16-19 Nukleotide langen, an Pyrimidinnukleotiden reichen Region. Angesichts der Tatsache, daß diese Sequenz auf dem gesamten SSV1-Genom nur neunmal vorkommt und niemals inmitten eines transkribierten Bereichs gefunden wurde (außer unmittelbar vor den 3'-Enden von Transkripten), handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um eine Signalstruktur zur Bildung dieser 3'-Enden. Es ist jedoch nicht eindeutig zu entscheiden, ob diese Sequenz ein Terminationssignal oder ein Signal zur RNA-Prozessierung darstellt. Im Falle endonukleolytischer Prozessierung von Transkripten ist zu erwarten, daß neben dem 3'-Ende der reifen RNA auch eine RNA mit dem zugehörigen 5'-Ende entsteht. Durch Northern-Analyse

waren solche RNAs jedoch in keinem Falle nachweisbar. Für das Transkript T2 wurde die Anwesenheit prozessierungsbedingter 5'-Enden mittels S1- und Primer-Extensions-Analyse überprüft, wobei das 5'-Ende von Transkript T9 gefunden wurde. Obwohl dieses 5'-Ende im "Terminationsbereich" von Transkript T2 kartiert, kommt es als Prozessierungsprodukt eines T2-Vorläufermoleküls kaum in Frage, da sich ein Teil der multiplen 3'-Enden von T2 in einer 3'-Position zum 5'-Ende von T9 befindet. Zudem ist die DNA-Sequenz oberhalb des 5'-Endes von T9 außerordentlich homolog zu derjenigen von T3 und T4, was darauf hindeutet, daß dieses 5'-Ende durch Transkriptionsinitiation zustande kommt. Es ist somit anzunehmen, daß die konservierten Sequenzen im Bereich der 3'-Enden der SSV1-Transkripte Terminationssignale darstellen.

Was Terminatorsequenzen in anderen Archaeobakterien angeht, so sind nur sehr wenige Kartierungsdaten verfügbar. Im Falle des 16S/23S rRNA-Operons des extrem thermophilen Archaeobakteriums *Thermoproteus tenax* wurde das 3'-Ende des Primärtranskripts auf einem C-Rest unmittelbar vor einer Sequenz TTTTCT kartiert (Kjems et al., 1987). Diese Sequenz entspricht der für SSV1 abgeleiteten Terminator-Konsensussequenz TTTTTYT und ist Teil eines 14 Nukleotide langen, nur aus Pyrimidinnukleotiden bestehenden Bereichs, was ebenfalls der Situation in SSV1 entspricht. Im Falle des methanogenen Archaeobakteriums *Methanococcus vanniellii* wurde das 3'-Ende des Primärtranskripts für ein rRNA-Operon auf dem mittleren T-Rest einer (T)₅-Sequenz kartiert, die sich unmittelbar an das 5S rRNA-Gen anschließt und auf die eine Palindromsequenz folgt (Wich et al., 1986). Eine ähnliche Situation scheint für ein rRNA-Operon aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* zuzutreffen, wenngleich die der Palindromsequenz vorausgehende Terminationsregion zwar reich an Pyrimidinnukleotiden ist, aber nicht auffällig viele T-Reste enthält (Østergaard et al., 1987). Was Transkripte für Proteingene angeht, so sind Kartierungsdaten für die 3'-Enden der

Bakterioopsin-mRNA aus *Halobacterium halobium* (DasSarma et al., 1984) und der mRNA für ein hoch exprimiertes Gen aus *Methanococcus voltae* (Müller et al., 1985) verfügbar. In beiden Fällen kartiert das 3'-Ende unmittelbar hinter einem Bereich hoher Sekundärstruktur, wobei jedoch nur im Falle der *Methanococcus*-mRNA ein Oligo T-Bereich folgt, was für rho-unabhängige eubakterielle Terminatoren typisch ist. Der Vergleich dieser Daten zeigt, daß es zur Zeit nur schwer möglich ist, eine allgemeine Aussage über die Art archaebakterieller Terminatorstrukturen zu machen. Die große Ähnlichkeit der vermutlichen Terminatorsequenzen auf dem SSV1-Genom mit der entsprechenden Sequenz für das rRNA-Primärtranskript aus *Thermoproteus tenax* läßt jedoch vermuten, daß in extrem thermophilen Archaeobakterien pyrimidinreiche Sequenzen mit mindestens fünf aufeinanderfolgenden T-Resten als Terminationssignale dienen können.

6. Funktionelle Bedeutung der SSV1-Transkripte

Die einzigen SSV1-Transkripte mit eindeutig bekannter Funktion sind die Transkripte T1 und T2, die ein gemeinsames 5'-Ende besitzen und sich nur in der Lage ihres 3'-Endes voneinander unterscheiden. T2 überdeckt den kodierenden Bereich für die drei SSV1-Strukturproteine VP1, VP2 und VP3, wobei diese Gene unmittelbar hintereinander in der Reihenfolge VP1-VP3-VP2 angeordnet sind (Abb. 30). Die N-terminale Aminosäure des Haupthüllproteins VP1 ist Glutaminsäure, so daß es für dieses Protein ein Vorläufermolekül geben muß, das proteolytisch prozessiert wird. Oberhalb des für den N-terminalen Glutaminsäurerest kodierenden Tripletts GAA findet man insgesamt drei mögliche Initiationskodons für ein solches Vorläufermolekül, bevor ein Stopkodon auftritt. Alle drei potentiellen Initiationskodons liegen innerhalb des transkribierten Bereichs (Abb. 30), so daß nicht eindeutig entschieden werden kann, wo die Translation startet. Die vergleichende Analyse von

—Transkripte T1+T2—→

1 TTCTGAATTCAGAACTGGAGGGGTTAAAAACGTAAGCGGGAAGCCGATATTGACCAAGGATGAGACTCCCTAAGGAGTTT
M R L L R S L

81 GGCAAGAAAGATAGCCTCACTCAAAGAGGCTAAGGTTGCACTAAAAGTAGCAAGCGACCCAGAAAGTACTTCAACGAAG
A R K I A S L K E A K V A L K V A S D P R K Y F N E E

161 AACAGATGACTGAGGCTTACAGGATATTCTGCGAGACATGGGACGGGACATAATTAGAAGTGCCTAGAAGGTTTCGTGGAA
Q M T E A Y R I F W Q T W D G D I I R S A R R F V E

241 GTAGCAAAGGCAACCCCAAGCTCAAAAAGGTGAAGCAACCAACATAGGCGTATTGTTGGGCTTATTCATCTTCATACT
V A K A N P K L T K G E A T N I G V L L G L F I F I L

VP1 →

321 AATAGGTATAGTACTATTGCCCGTAATCGTTAGCCAAGTCAACCACTCAAGCGGTACTTCACCCCAAGTAACCGGTA
I G I V L L P V I V S Q V N N L T S G T S P Q V T G T

401 CTAAAGCCACACTCTGAACTTAGTGCCGTATTCTATATCCTAGTCTCATAATAGTCCCGCAGTCGTGGCGTATAAG
N A T L L N L V P L F Y I L V L I I V P A V V A Y K

481 ATATACAAAGACTGAGGTGTGAGGGATGGAATCAGTTTAAAGCCAATCATTTTTTGGTCGTTTTATCATCGTAGGGA
I Y K D M E I S L K P I I F L V V F I I V G I

VP3 →

561 TAGCACTATTTCGGCCCTATAAACAGTGTGTAATAACGTTACCACATCGGGAACCTACACTACTATAGTTTCCGGTACT
A L F G P I N S V V N N V T T S G T Y T T I V S G T

641 GTTACTACGCTCTTCATTTGTGTCAAATCCGCAATCAGTAGGTAGCAATAACGCTACTATCGTAGCCTTAGTGCCGTTATT
V T T S S F V S N P Q Y V G S N N A T I V A L V P L F

721 CTATATCCTAGTCCTCATAATAGTCCCGCAGTCGTGGCGTATAAGTTGTATAAGGAGGAGTGATATGAAGTGGGTGCAA
Y I L V L I I V P A V V A Y K L Y K E E M K W V Q

VP2 →

801 AAGGCGATAAAGAGACCCGGGAGGTACATCGCTACCTTATGAGGCTCTACGGCAAACGGGCGTTTACAAAAGACGTTGA
K A I K R P G R V H R Y L M R L Y G K R A F T K D G D

881 CATAAAGGCAAGTTATCTCGATAAGGCGATAAAGCACGTTAAAAAGCTAAGATCCCGAAAGAGAAGAACGTAAGTTTAC
I K A S Y L D K A I K H V K K A K I P K E K K R S L L

961 TGTACGCCCTACTGTTTAGGCAAAAGGCTTAAGCGGATGCACCGCAAGTAGGCCCTTTATAAGTCATATCTTTTCTTTT
S A L L L A K R R L K R M H R K

—Transkript T9—→

1041 CCCTGATGAGTGTGCGTTAGGGGATGTAATCTACATCTTGGGTTTCTCTTTCCGGCTTAGGGCTAATCAGCCGAAACTAT
M S A L G D V I Y I L G F L F P A L G L I S R N Y

ORF →

Abbildung 30. DNA-Sequenz im Bereich der Transkripte T1 und T2.

Die Aminosäuresequenzen offener Leserahmen sind unterhalb der DNA-Sequenz angegeben. In zwei Fällen (VP2 und VP3) fallen diese offenen Leserahmen genau mit Genen für SSV1-Strukturproteine zusammen. Im Falle des Haupthüllproteins VP1 ist der entsprechende Leserahmen N-terminal um 71 Aminosäuren länger als das reife Genprodukt. Mögliche translationelle Initiationskodons für ein VP1-Vorläuferprotein sind durch schmale Balken oberhalb der DNA-Sequenz angedeutet. Vermutliche Ribosomenbindungsstellen sind durch ausgefüllte Kreise gekennzeichnet. In denjenigen Fällen, in denen zwei mögliche Ribosomenbindungsstellen gefunden wurden, ist die Alternativsequenz durch leere Kreise markiert. Breite Balken oberhalb der DNA-Sequenz kennzeichnen einen 61 Nukleotide langen Bereich innerhalb des VP1-Gens, der im Gen für VP3 exakt wiederholt wird. S1-kartierte Terminationspunkte von T1 bzw. T2 sind durch Sterne oberhalb der DNA-Sequenz angedeutet. Vermutliche Promotorelemente sind fett unterstrichen.

Ribosomenbindungsstellen oberhalb dieser möglichen Initiationskodons legt jedoch die Vermutung nahe, daß ein GUG-Kodon 36 Nukleotide oberhalb des Gens für reifes VP1 ein wahrscheinlicher Kandidat für die Initiation der Translation ist (Abb. 30). Das SSV1-Transkript T1 terminiert im Anfangsbereich des Gens für VP3 und kodiert somit nur VP1 (Abb. 30). Aus relativen Hybridisierungsintensitäten von T1 und T2 mit DNA-Proben aus dem 5'-Bereich beider Transkripte kann abgeschätzt werden, daß diese Termination eine Effizienz von etwa 80% aufweist. Auf diese Weise wird offenbar sichergestellt, daß das Haupthüllprotein VP1 in erheblich größerer Menge produziert wird als VP2 und VP3.

An das Gen für VP2 schließen sich insgesamt sechs unmittelbar hintereinander liegende offene Leserahmen an, wobei das translationelle Initiationkodon für den ersten dieser Leserahmen ein einziges Nukleotid unterhalb des 5'-Endes von Transkript T9 liegt (Abb. 30). Da T9 nicht als diskrete Bande bei der Northern-Analyse identifiziert werden konnte, ist unklar, ob alle diese Leserahmen kotranskribiert werden.

Die Transkripte T3 und T4 scheinen monocistronische mRNAs für Proteine von 291 bzw. 792 Aminosäuren Länge darzustellen. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, daß die Lage beider RNAs auf dem SSV1-Genom praktisch genau mit entsprechenden offenen Leserahmen zusammenfällt, die jeweils ein Nukleotid unterhalb des 5'-Endes der Transkripte beginnen. Beide hypothetische Proteine sind sehr hydrophob, was eine Funktion als Strukturproteine nahelegt. Bisher wurden nur die drei Proteine VP1, VP2 und VP3 als Bestandteile von SSV1 identifiziert, wobei VP2 an die virale DNA gebunden ist (Reiter *et al.*, 1987a). Die Form der SSV1-Partikel und das Vorkommen schwanzfaserartiger Strukturen lassen jedoch darauf schließen, daß die virusartigen Partikel aus mehr als drei Proteinen aufgebaut sind.

Im Falle der Transkripte T5 und T6 ist nicht klar, ob diese RNAs Proteine kodieren. Zwar liegen einige offene Leserahmen im Bereich dieser Transkripte, jedoch läßt die Instabilität von T5 und T6 *in vivo* Zweifel daran aufkommen, ob es sich bei diesen beiden Transkripten wirklich um mRNAs handelt. Eine Besonderheit der Transkripte T5 und T6 ist, daß sie an der gleichen relativen Position innerhalb eines 64 Nukleotide langen "inverted repeat" starten, wobei die DNA in der Umgebung der Transkriptionsstarts vier Kopien einer elf Nukleotide langen Sequenz enthält. Außerdem treten im Bereich zwischen den Transkriptionsstarts von T5 und T6 auf beiden Strängen häufig Sequenzen auf, bei denen T-Reste mit A- und C-Resten alternieren. Dies führt zum Auftreten eines komplizierten Musters aus Sequenzwiederholungen in diesem Bereich. Die Anwesenheit solcher mehrfach wiederholter Sequenzelemente ist ein typisches Merkmal einiger Replikationsorigins (z.B. derjenigen bestimmter eubakterieller Plasmide; zur Übersicht siehe Scott, 1984) und es ist somit eine attraktive Spekulation, daß die Transkripte T5 und T6 an der Initiation der DNA-Synthese auf dem SSV1-Genom beteiligt sind. Zur Bestätigung oder zur Widerlegung dieser Spekulation ist jedoch das eingehende

Studium der SSV1-Replikation, insbesondere die Kartierung des Replikationsorigins, nötig. Aufgrund seiner Lage zwischen den Startpunkten von T5 und T6 gilt die gleiche Spekulation auch für das UV-induzierbare Transkript T_{ind} . Die Expression dieser RNA beginnt etwa eine Stunde vor dem Einsetzen der UV-induzierten Amplifikation des SSV1-Genoms, so daß T_{ind} eventuell eine Rolle bei der Initiation der UV-abhängigen DNA-Synthese spielt. T_{ind} könnte ein Protein von 49 Aminosäuren Länge kodieren, wobei der entsprechende Leserahmen exakt am 5'-Ende der RNA beginnt. Wegen der geringen Länge dieses Leserahmens muß jedoch damit gerechnet werden, daß er zufallsbedingt ist und nicht exprimiert wird, wenngleich die Anwesenheit einer möglichen Ribosomenbindungsstelle am 5'-Ende von T_{ind} für eine Expression dieses Proteins spricht.

7. Signalstrukturen für die Initiation der Translation in *Sulfolobus* B12

Die hohe Sequenzkonservierung des 3'-Endes der 16S rRNA zwischen Eubakterien und Archaeobakterien (Steitz, 1978) sowie die vergleichende Analyse der DNA-Sequenzen oberhalb der translationellen Initiationskodons archaeobakterieller Gene (zur Übersicht siehe Dennis, 1986) lassen darauf schließen, daß in beiden prokaryotischen Reichen der translationelle Initiationspunkt in gleicher Weise festgelegt wird, nämlich über eine Komplementarität zwischen Sequenzen auf der mRNA und dem 3'-Ende der 16S rRNA (Shine & Dalgarno, 1974).

Im Falle der SSV1-Strukturproteine VP2 und VP3, bei denen der Translationsstart mit Sicherheit bekannt ist, treten mögliche Ribosomenbindungsstellen in einem Abstand von einigen Nukleotiden oberhalb der zugehörigen Initiationskodons auf (Abb. 30). Im Falle der Transkripte T3, T4, T9 und T_{ind} beginnen offene Leserahmen bei Position +1 (T_{ind})

bzw. +2 (T3, T4, T9), so daß keine Möglichkeit für die Anwesenheit von Ribosomenbindungsstellen oberhalb der vermutlichen Translationsstarts besteht. In allen diesen Fällen wurden jedoch zum 3'-Ende der 16S rRNA komplementäre Sequenzen im Anfangsbereich der Transkripte gefunden. Diese hypothetischen Ribosomenbindungsstellen überdecken dabei die ersten zwei bis drei Kodons der zugehörigen offenen Leserahmen. Wegen der fehlenden Identifizierung der entsprechenden Proteine ist es prinzipiell möglich, daß diese Leserahmen nicht translatiert werden und es ist weiterhin möglich, daß die Proteinbiosynthese an AUG- oder GUG-Kodons startet, die weiter innerhalb der Transkripte liegen. Gegen die erste Möglichkeit spricht jedoch die beträchtliche Länge der Leserahmen zumindest im Falle von T3 und T4 (291 bzw. 792 Aminosäuren) und auch die zweite Möglichkeit erscheint wenig wahrscheinlich, da für die im Leseraster liegenden möglichen weiteren Startkodons keine überzeugenden Ribosomenbindungsstellen gefunden wurden. Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß auch im Falle des halobakteriellen Membranproteins Bakterioopsin die Translation sehr nahe am 5'-Ende der mRNA beginnt (bei Position +3) und für die Expression dieses Proteins die Anwesenheit einer im kodierenden Bereich liegenden Ribosomenbindungsstelle postuliert wurde (DasSarma et al., 1984).

8. Integrationsstellen der SSV1-DNA

Die Analyse SSV1-homologer chromosomaler Sequenzen von *Sulfolobus* B12 hatte ergeben, daß das SSV1-Genom in voller Länge ortsspezifisch integriert ist und zusätzlich mindestens ein defekter SSV1-Prophage vorliegt. Die Anwesenheit defekter Prophagen im Genom eines lysogenen Wirtes wurde auch im Falle des Bakteriophagen λ in *Escherichia coli* K12 beschrieben (Kaiser & Murray, 1979); sie weist darauf hin, daß der entsprechende Phage seit geraumer Zeit mit seinem Wirt koevolviert. SSV1 liegt in den

"lysogenen" Zellen sowohl ortsspezifisch integriert als auch als cccDNA vor. Diese Art der Lysogenie ist für Bakteriophagen eher ungewöhnlich, wenngleich eine ähnliche Situation im Falle des Satelliten-Bakteriophagen P4 von *E. coli* gefunden wurde (Goldstein et al., 1982; Deho et al., 1984).

Die Untersuchung zweier chromosomaler Integrationsstellen von SSV1 hatte ergeben, daß in beiden Fällen tRNA-Gene (oder tRNA-Pseudogene) Zielsequenzen der SSV1-Integration sind, wobei die attP-Sequenz den 44 3'-terminalen Nukleotiden der tRNA entspricht. tRNA-Gene als Zielsequenz für die Integration von Bakteriophagen wurden auch im Falle des Coliphagen P4 und des *Salmonella*-Phagen P22 beschrieben (Pierson III & Kahn, 1987). Im Falle von P4 entspricht die zwischen Phage und Bakterium konservierte att-Sequenz den 20 Basen am 3'-Ende des tRNA-Gens *leuX* (Pierson III & Kahn, 1987), während diese Sequenz im Falle von P22 den 46 3'-terminalen Basen eines zuvor unbekannten Gens für tRNA^{Thr} entspricht (Leong et al., 1985; Pierson III & Kahn, 1987). In allen drei Fällen (P4, P22 und SSV1) endet die att-Sequenz genau am 3'-Ende des jeweiligen tRNA-Gens, wobei eine überraschende Übereinstimmung in der Länge dieser Sequenz zwischen P22 und SSV1 vorliegt (46 bzw. 44 Nukleotide). Wegen dieser Ähnlichkeiten in der Zielsequenz der Integration liegt die Annahme nahe, daß auch die für diese Integration verantwortlichen Enzyme homolog sein könnten. Die Aminosäuresequenzen der Integrasen von P4 und P22 sind bekannt, jedoch sind die Homologien zwischen diesen Sequenzen sehr gering (Argos et al., 1986). Erwartungsgemäß konnte auf dem SSV1-Genom somit auch kein überzeugender Kandidat für ein Integrase-Gen gefunden werden (P. Palm, persönliche Mitteilung), wenngleich ein 335 Aminosäuren langes, im Bereich der attP-Sequenz kartierendes hypothetisches Protein eine ähnliche Länge und eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie die bekannten Integrasen aufweist.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J.B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R.H., Kahn, M.L., Kalionis, B., Narayana, S.V.L., Pierson III, L.S., Sternberg, N. & Leong, J.M. (1986) The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. EMBO J. 5, 433-440.

Ausubel, F.M. (1984) Regulation of nitrogen fixation genes. Cell 37, 5-6.

Betlach, M., Friedman, J., Boyer, H.W. & Pfeifer, F. (1984) Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression. Nucl. Acids Res. 12, 7949-7959.

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

Blanck, A. & Oesterhelt, D. (1987) The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. EMBO J. 6, 265-273.

Böck, A., Hummel, H., Jarsch, M. & Wich, G. (1986) Genes for stable RNA in methanogens: phylogenetic and functional aspects. In: Biology of Anaerobic Bacteria (H.C. Dubourguier et al., Hrsg.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, S. 206-226.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. & Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.

Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41, 459-472.

Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T. & Weiss, R.L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch. Microbiol. 84, 54-68.

Bucher, P. & Trifonov, E.N. (1986) Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. Nucl. Acids Res. 14, 10009-10026.

Dams, E., Londei, P., Cammarano, P., Vandenberghe, A. & De Wachter, R. (1983) Sequences of the 5S rRNAs of the thermo-acidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* (*Caldariella acidophila*) and the thermophilic eubacteria *Bacillus acidocaldarius* and *Thermus aquaticus*. Nucl. Acids Res. 11, 4667-4676.

Daniels, C.J., Gupta, R. & Doolittle, W.F. (1985) Transcription and excision of a large intron in the tRNA^{Trp} gene of an archaeobacterium, *Halobacterium volcanii*. J. Biol. Chem. 260, 3132-3134.

DasSarma, S., RajBhandary, U.L. & Khorana, H.G. (1984) Bacterio-opsin mRNA in wild-type and bacterio-opsin-deficient *Halobacterium halobium* strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 125-129.

Deho, G., Ghisotti, D., Alano, P., Zangrossi, S., Borrello, M.G. & Sironi, G. (1984) Plasmid mode of propagation of the genetic element P4. J. Mol. Biol. 178, 191-207.

Dennis, P.P. (1985) Multiple promoters for the transcription of the ribosomal RNA gene cluster in *Halobacterium cutirubrum*. J. Mol. Biol. 186, 457-461.

Dennis, P.P. (1986) Molecular biology of archaebacteria. *J. Bact.* 168, 471-478.

Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12, 387-395.

Doel, M.T., Houghton, M., Cook, E.A. & Carey, N.H. (1977) The presence of ovalbumin mRNA coding sequences in multiple restriction fragments of chicken DNA. *Nucl. Acids Res.* 4, 3701-3713.

Doi, R.H. & Wang, L.-F. (1986) Multiple procaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. *Microbiol. Rev.* 50, 227-243.

Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.

Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (Addendum). *Anal. Biochem.* 137, 266-267.

Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. & Murray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.

Goldstein, R., Sedivy, J. & Ljungquist, E. (1982) Propagation of satellite phage P4 as a plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 515-519.

Gray, M.W. & Doolittle, W.F. (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev.* 46, 1-42.

Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28, 351-359.

Hu, N. & Messing, J. (1982) The making of strand-specific M13 probes. *Gene* 17, 271-277.

Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983) Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J.* 2, 1291-1294.

Kaine, B.P., Gupta, R. & Woese, C.R. (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3309-3312.

Kaine, B.P. (1987) Intron-containing tRNA genes of *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Evol.* 25, 248-254.

Kaiser, K. & Murray, N.E. (1979) Physical characterization of the "Rac prophage" in *E. coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 175, 159-174.

Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. & Cesareni, G. (1980) Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5172-5176.

Kessel, M. & Klink, F. (1980) Archaeobacterial elongation factor is ADP-ribosylated by diphtheria toxin. *Nature* 287, 250-251.

Kieny, M.P., Lathe, R. & Lecocq, J.P. (1983) New versatile cloning and sequencing vectors based on bacteriophage M13. *Gene* 26, 91-99.

Kjems, J. & Garrett, R.A. (1985) An intron in the 23S ribosomal RNA gene of the archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Nature* 318, 675-677.

- Kjems, J., Leffers, H., Garrett, R.A., Wich, G., Leinfelder, W. & Böck, A. (1987) Gene organization, transcription signals and processing of the single ribosomal RNA operon of the archaebacterium *Thermoproteus tenax*. Nucl. Acids Res. 15, 4821-4835.
- Kushner, D.J. (1985) The Halobacteriaceae. In: The Bacteria, Band VIII (C.R. Woese & R.S. Wolfe, Hrsg.), Academic Press, S. 171-214.
- Larsen, N., Leffers, H., Kjems, J. & Garrett, R.A. (1986) Evolutionary divergence between the ribosomal RNA operons of *Halococcus morrhuae* and *Desulfurococcus mobilis*. System. Appl. Microbiol. 7, 49-57.
- Lechner, K. & Böck, A. (1987) Cloning and nucleotide sequence of the gene for an archaebacterial protein synthesis elongation factor Tu. Mol. Gen. Genet. 208, 523-528.
- Lechner, J. & Sumper, M. (1987) The primary structure of a procaryotic glycoprotein. Cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of halobacteria. J. Biol. Chem. 262, 9724-9729.
- Leffers, H., Kjems, J., Østergaard, L., Larsen, N. & Garrett, R.A. (1987) Evolutionary relationships amongst archaebacteria. A comparative study of 23S ribosomal RNAs of a sulphur-dependent extreme thermophile, an extreme halophile and a thermophilic methanogen. J. Mol. Biol. 195, 43-61.
- Leong, J.M., Nunes-Düby, S., Lesser, C.F., Youderian, P., Susskind, M.M. & Landy, A. (1985) The ϕ 80 and P22 attachment sites. Primary structure and interaction with *Escherichia coli* integration host factor. J. Biol. Chem. 260, 4468-4477.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Martin, A., Yeats, S., Janekovic, D., Reiter, W.-D., Aicher, W. & Zillig, W. (1984) SAV1, a temperate u.v.-inducible DNA virus-like particle from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. EMBO J. 3, 2165-2168.

Messing, J. & Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene 19, 269-276.

Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101, 20-78.

Müller, B., Allmansberger, R. & Klein, A. (1985) Termination of a transcription unit comprising highly expressed genes in the archaebacterium *Methanococcus voltae*. Nucl. Acids Res. 13, 6439-6445.

Nasmyth, K. (1983) Molecular analysis of a cell lineage. Nature 302, 670-676.

Neumann, H., Gierl, A., Tu, J., Leibrock, J., Staiger, D. & Zillig, W. (1983) Organization of the genes for ribosomal RNA in archaebacteria. Mol. Gen. Genet. 192, 66-72.

Norrandar, J., Kempe, T. & Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26, 101-106.

Østergaard, L., Larsen, N., Leffers, H., Kjems, J. & Garrett, R. (1987) A ribosomal RNA operon and its flanking region from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Marburg strain: transcription signals, RNA structure and evolutionary implications. *System. Appl. Microbiol.* 9, 199-209.

Olsen, G.J., Pace, N.R., Nuell, M., Kaine, B.P., Gupta, R. & Woese, C.R. (1985) Sequence of the 16S rRNA gene from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* and its evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* 22, 301-307.

Pace, N.R., Olsen, G.J. & Woese, C.R. (1986) Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45, 325-326.

Pierson III, L.S. & Kahn, M.L. (1987) Integration of satellite bacteriophage P4 in *Escherichia coli*. DNA sequences of the phage and host regions involved in site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* 196, 487-496.

Prangishvili, D. (1986) DNA-dependent DNA polymerases of thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Mol. Biol.* 20, 477-488.

Pühler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H.-P., Lottspeich, F., Garrett, R. & Zillig, W. (1988) Manuskript in Vorbereitung.

Reiter, W.-D., Palm, P., Henschen, A., Lottspeich, F., Zillig, W. & Grampp, B. (1987a) Identification and characterization of the genes encoding three structural proteins of the *Sulfolobus* virus-like particle SSV1. *Mol. Gen. Genet.* 206, 144-153.

Reiter, W.-D., Palm, P., Yeats, S. & Zillig, W. (1987b) Gene expression in archaeobacteria: Physical mapping of constitutive and UV-inducible transcripts from the *Sulfolobus* virus-like particle SSV1. *Mol. Gen. Genet.* 209, 270-275.

Reiter, W.-D., Palm, P., Voos, W., Kaniecki, J., Grampp, B., Schulz, W. & Zillig, W. (1987c) Putative promoter elements for the ribosomal RNA genes of the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12. *Nucl. Acids Res.* 15, 5581-5595.

Reiter, W.-D., Palm, P. & Zillig, W. (1988) Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucl. Acids Res.* 16, 1-19.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. & Roe, B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143, 161-178.

Sather, S. & Agabian, N. (1985) A 5' spliced leader is added *in trans* to both α - and β -tubulin transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5695-5699.

Scott, J.R. (1984) Regulation of plasmid replication. *Microbiol. Rev.* 48, 1-23.

Shenk, T. (1981) Transcriptional control regions: Nucleotide sequence requirements for initiation by RNA polymerase II and III. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 93, 25-46.

Shine, J. & Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Woese, C.R. & Pace, N.R. (1981) An unusual 5S rRNA, from *Sulfolobus acidocaldarius*, and its implications for a general 5S rRNA structure. *Nucl. Acids Res.* 9, 6129-6137.

Steitz, J.A. (1978) Methanogenic bacteria. *Nature* 273, 10.

Stetter, K.O. & Zillig, W. (1985) *Thermoplasma* and the thermophilic, sulfur-dependent archaeobacteria. In: *The Bacteria*, Band VIII (C.R. Woese & R.S. Wolfe, Hrsg.), Academic Press, S. 85-170.

Thomas, P.S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol.* 100, 255-266.

Tu, J. & Zillig, W. (1982) Organization of rRNA structural genes in the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucl. Acids Res.* 10, 7231-7245.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619.

Whitman, W.B. (1985) Methanogenic bacteria. In: The Bacteria, Band VIII (C.R. Woese & R.S. Wolfe, Hrsg.), Academic Press, S. 3-84.

Wich, G., Jarsch, M. & Böck, A. (1984) Apparent operon for a 5S ribosomal RNA gene and for tRNA genes in the archaeobacterium *Methanococcus vanniellii*. Mol. Gen. Genet. 196, 146-151.

Wich, G., Hummel, H., Jarsch, M., Bär, U. & Böck, A. (1986) Transcription signals for stable RNA genes in *Methanococcus*. Nucl. Acids Res. 14, 2459-2479.

Wich, G., Leinfelder, W. & Böck, A. (1987) Genes for stable RNA in the extreme thermophile *Thermoproteus tenax*: introns and transcription signals. EMBO J. 6, 523-528.

Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090.

Woese, C.R., Magrum, L.J. & Fox, G.E. (1978) Archaeobacteria. J. Mol. Evol. 11, 245-252.

Woese, C.R. & Olsen, G.J. (1986) Archaeobacterial phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. System. Appl. Microbiol. 7, 161-177.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

Yeats, S., McWilliam, P. & Zillig, W. (1982) A plasmid in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. EMBO J. 1, 1035-1038.

Zabel, H.-P., Fischer, H., Holler, E. & Winter, J. (1985) *In vivo* and *in vitro* evidence for eucaryotic α -type DNA polymerases in methanogens. Purification of the DNA polymerase of *Methanococcus vannielii*. System. Appl. Microbiol. 6, 111-118.

Zillig, W., Schnabel, R. & Stetter, K.O. (1985a) Archaeobacteria and the origin of the eukaryotic cytoplasm. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 114, 1-18.

Zillig, W., Stetter, K.O., Schnabel, R. & Thomm, M. (1985b) DNA-dependent RNA polymerases of the archaeobacteria. In: The Bacteria, Band VIII (C.R. Woese & R.S. Wolfe, Hrsg.), Academic Press, S. 499-524.

Zillig, W., Gropp, F., Henschen, A., Neumann, H., Palm, P., Reiter, W.-D., Rettenberger, M., Schnabel, H. & Yeats, S. (1986) Archaeobacterial virus host systems. System. Appl. Microbiol. 7, 58-66.

VII. ABKÜRZUNGEN

SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PEG	Polyethylenglykol
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
bp	Basenpaare
kb	Kilobasen
rpm	Umdrehungen pro Minute
cpm	Gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
OD	Optische Dichte

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 18.9.1957

Geburtsort: Berlin

Schulen:

Grundschule in Kaufering 1963-1967

Gymnasium in Landsberg/Lech 1967-1976

Abitur 1976

Zivildienst 1976-1977

Studium der Biochemie an der
Universität Tübingen 1978-1985

Diplom 2.5.1985

Doktorarbeit unter Anleitung
von Prof. W. Zillig am
Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried
Mai 1985 - Dez. 1987

Otto-Hahn-Medaille der
Max-Planck-Gesellschaft
Juni 1986

